Aus dem Forschungsinstitut für Hygiene und Immunitätslehre zu Berlin-Dahlem (Direktor: Prof. Dr. Ernst Friedberger †)

Variationen bei Bakterien

I. Experimentelle Versuche zur Steigerung der BCG-Virulenz durch Dissoziation auf Eiernährböden und durch mitogenetische Bestrahlung

II. Experimentelle Virulenzsteigerung von Choleravibrionen durch Selektion überlebender Stämme

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der

Medizinischen Doktorwürde

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

vorgelegt von

Felix Sulmann

Dr. med. vet. aus Berlin

Tag der Promotion: 1. November 1933

Jena

Gustav Fischer

1933

164

Aus dem Forschungsinstitut für Hygiene und Immunitätslehre zu Berlin-Dahlem (Direktor: Prof. Dr. Ernst Friedberger †)

Variationen bei Bakterien

I. Experimentelle Versuche zur Steigerung der BCG-Virulenz durch Dissoziation auf Eiernährböden und durch mitogenetische Bestrahlung

II. Experimentelle Virulenzsteigerung von Choleravibrionen durch Selektion überlebender Stämme

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der

Medizinischen Doktorwürde

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

vorgelegt von

Felix Sulmann
Dr. med. vet. aus Berlin

Tag der Promotion: 1. November 1933

Jena
Gustav Fischer
1933

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Gocht
Referent: Prof. Dr. Schütz
Korreferent: Prof. Dr. Rößle

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Abdruck aus der
Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie.
Bd. 81. 1933.
Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

I. Experimentelle Versuche zur Steigerung der BCG-Virulenz durch Dissoziation auf Eiernährböden und durch mitogenetische Bestrahlung.

Nachdem durch die Untersuchungen von J. A. Arkwright, De Kruif, P. H. Hadley, S. A. Petroff die Tatsache der Bakteriendissoziation Eingang in die Literatur gefunden hatte, wurde das Problem der Virulenzsteigerung durch Dissoziation 1930 nach dem Sterben von 76 Kindern in Lübeck im Anschluß an eine BCG-Vakzination hochakut.

Prof. Friedberger, der noch kurz vor seinem Tode als Sachverständiger in diesem Prozeß mitwirkte, hatte Dr. S. Callerio (z. Z. in Pavia) und mich mit der Bearbeitung des Variationsproblems und der dazu gehörigen Modellversuche beauftragt. Bei der Ausführung dieser Versuche unterstützten mich die beiden technischen Volontärassistentinnen des Institutes, Frl. stud. med. E. Grzebinasch und Frl. I. Wagner, wofür ihnen an dieser Stelle nochmals verbindlichster Dank gesagt sei.

Die Problemstellung war folgende: Was bedeutet es erbbiologisch, wenn ein Stamm wie der BCG virulent wird, und welches sind die Bedingungen hierfür? — Es steht fest, daß der BCG-Ausgangsstamm früher einmal (vor Calmettes Züchtungsversuchen 1906) ein virulenter Tuberkelstamm vom Typus bovinus gewesen ist. Seine allmählige Mitigierung auf Galle-Kartoffel-Nährböden ist also eine durch Hungernährböden und chronische Intoxikation eingetretene zytoplasmatische Schädigung eines seiner biologischen Merkmale gewesen. Diese Virulenzabschwächung läßt sich bei Ueberpflanzung auf andere Medien im allgemeinen nicht verändern, sie ist also eine Modifikation von einer gewissen Dauerhaftigkeit (Dauermodifikation von V. Jollos). Es ist nun nicht einzusehen, warum unter günstigeren Nährbodenbedingungen die Dauerhaftigkeit dieser Modifikation nicht zu verkürzen wäre. Es würde dann also unter eugonischen Wachstumsbedingungen nicht eine Variation, auch nicht eine Dissoziation, sondern nur eine Regeneration verlorengegangener

Eigenschaften einzusetzen haben, ein Vorgang, der durch das Rehabilitierungsbestreben des Bakterienidioplasmas zu erklären wäre (Remutation nach M. Mandelbaum).

Es ist aus der Vererbungslehre und den klassischen Mendelschen Regeln bekannt, daß durch Amphimixis — also bei geschlechtlicher Vermehrungsart — durch den hier zwangsläufig auftretenden Akt der Chromosomenreduktion vom diploiden zum haploiden Format eine Ausmerzung von Chromosomenanteilen und Vererbungsanlagen möglich ist; d. h. bei einer Kreuzung können in der zweiten Filiargeneration Rassen entstehen, die nur noch die Merkmale eines der „mendelnden" Vorfahren besitzen. Diese Erbgesetze treffen sicher bei Bakterien nicht zu; das Gegenteil wird allein von Almquist, Löhnis, Enderlein und ihren Anhängern angenommen, ist aber nicht erwiesen. Es fehlt den Bakterien jener entscheidende Vorgang der Chromosomenreduktion; denn die Vermehrung der Bakterien ist ein ungeschlechtliches Weiterwachsen elterlichen Plasmas (vgl. van Loghems Individualitätstheorie).

Wir kennen zurzeit noch keinen Vorgang, durch den es mit Sicherheit gelingt, die Eigenschaften eines Bakterienstammes zum Verschwinden zu bringen, wir wissen nur, daß wir sie temporär abschwächen können. Es ist ebenso die Unmöglichkeit der Restitution mitigierter Virulenz bisher durch nichts erwiesen, ja die Möglichkeit der Virulenzsteigerung im Tierversuch ist ein tausendfältig belegtes und feststehendes Faktum.

Interessant ist auch die Tatsache, daß es gelegentlich gelingt, die Virulenz von Bakterien spezifisch für eine Tierart zu steigern, wenn man Blut oder Serum dieser Spezies dem Nährboden zufügt. Von solchen Versuchen berichten Roger, Trommsdorff, Danysz, neuerdings beim BCG auch K. T. Sasano und E. M. Medlar (1931). Bedenkt man nun, daß 1929/30 K. Deycke in Lübeck zur Züchtung des todbringenden BCG nicht nur einen eugonischen Eiernährboden, sondern sogar solchen mit Menschenblutzusatz nach Hohn benutzte, so erscheint es begreiflich, daß hier gerade eine spezifische Virulenz für den Menschen auftreten konnte! Es liegt durchaus im Sinne dieser Vermutung, daß die von L. Lange vorgenommenen Tierversuche mit dem betreffenden Material in manchen Fällen eine Tiervirulenz vermissen ließen: in 2 Fällen wurden aus den Organen der gestorbenen Kinder Stämme mit BCG-Eigenschaften, allerdings in den restlichen 11 bzw. 27 Fällen Stämme mit Typus-humanus-Eigenschaften gezüchtet. Insbesondere beweisen auch Versuche O. Kirchners, daß die aus den in Lübeck gestorbenen Kindern gezüchteten Tuberkelbazillenstämme bei Meerschweinchen nur eine chronische, mäßig progrediente Tuberkulose erzeugt haben.

Diese Ueberlegungen lassen es uns als möglich erscheinen, daß der Lübecker BCG-Stamm durch Kultur auf dem menschenbluthaltigen Hohnschen Nährboden gewissermaßen „auf den Menschen dressiert" worden ist.

Es ist dabei nicht einmal nötig, daß dieser Rück- bzw. Umschlag der Virulenz in allen Fällen erfolgte, denn die Entstehung von Varianten und Standortsmodifikationen ist ein Ereignis, das durch Unregelmäßigkeit und unsichere Reproduzierbarkeit gekennzeichnet ist.

Auf der anderen Seite stehen allerdings die Indizien von L. Lange (auffallende Vergrünung der Lübecker virulenten BCG-Stämme und des der Verwechselung verdächtigen humanen Stammes „Kiel"), ferner die vergleichenden Untersuchungen der Lipoidfraktionen von M. Hahn und E. Chargaff; beides Untersuchungen, die für eine Kontamination des Lübecker BCG mit dem virulenten Tuberkelstamm „Kiel" sprechen.

Immerhin ist auch in der Weltliteratur in zahlreichen Laboratoriumsversuchen über Virulenzsteigerung beim BCG berichtet worden. Wir dürfen hier aber nicht die durch Infektionsmodus und hohe Dosen erzielten pathologischen Veränderungen und Todesfälle bei Versuchstieren als Maßstab der Virulenz nehmen. Selbstverständlich gelingt es, durch intravenöse Applikation hoher BCG-Dosen bei Versuchstieren eine tödliche miliare Tuberkulose der Lunge und vielleicht auch anderer Organe (wenn die Lunge nicht ausreichend filtert) zu erzielen. Diese zuerst von Calmette und seiner Schule negierte Tatsache wird heute auch von ihm zugegeben. Aber die Virulenzproben sind nur dann anzuerkennen, wenn auch bei Passageversuchen die Virulenz des betreffenden Stammes auch bei Anwendung kleinster Dosen erhalten bleibt oder sich gar steigern läßt. In den Händen der meisten Autoren sind aber derartige Passageversuche fehlgeschlagen.

Bezüglich der zusammenfassenden Literatur über die Virulenz des BCG sei verwiesen auf die Arbeiten von: A. Calmette (1923/32) und die „Documents" des Instituts Pasteur (1930/32), R. Kraus (1927/32), F. Gerlach (1927/30), H. H. Kalbfleisch und A. Nohlen (1929), B. Lange (1930), H. J. Tiedemann (1930), F. Weleminsky (1930/32), E. Berger (1931), C. Rupilius (1931), A. Nohlen (1932).

Wir wollen hier nur kurz hinweisen auf die zahlreichen zur Virulenzsteigerung des BCG studierten Methoden:

1) Virulenzsteigerung durch Verimpfung großer Dosen versuchten: B. Galli-Valerio (1927), F. Gerlach (1927/32), H. Chiari, E. Nobel und A. Solé (1927/28), A. Bocchini (1928), Ramirez Corria (1929), Pla y Armengol und J. G. Massanella (1929), Ramzin (1929), M. Malkani (1930/31), W. Blumenberg (1931).

2) Virulenzsteigerung durch Infektion in reaktionsschwachen Organen versuchten: E. Berger, H. Hunziker und A. Staehelin (1928), E. M. Claveaux, L. J. Murguia und C. Estable (1930), ferner S. W. Korschun und Mitarbeiter (P. P. Dwijkoff, A. J. Gorochownikowa, V. Krestownikowa 1927/29).

3) Virulenzsteigerung bei langer Beobachtungsdauer versuchten: E. A. Watson, McIntosh und Konst (1928), P. Uhlenhuth und W. Seiffert (1930).

4) Virulenzsteigerung durch Ernährungsstörung der Versuchstiere versuchten: F. v. Hutyra und Schütz (1929/30).

5) Virulenzsteigerung durch Sekundärinfektion und Symbiose mit anderen Erregern versuchten: A. Ascoli (1927/31), T. van Heelsbergen (1932), M. J. King und W. H. Park (1929), W. H. Park (1930), E. Hormaeche und Mitarbeiter (Dominguez und Mackinnon 1930), J. Lignières (1929/31).

6) Virulenzsteigerung durch Intoxikation der Versuchstiere versuchten: O. Kirchner und Mitarbeiter (Schnieder, Newton, Tiedemann 1928/32), A. Nohlen u. M. Sarvan (1931), A. Komis (1932).

7) Virulenzerhöhung durch Kultur auf Serumnährböden versuchten: K.T. Sasano und E. M. Medlar (1931); ähnliche Ergebnisse auf eiweißhaltigen Nährböden erzielten C. Praußnitz (1930/31), Tory (1931), A. Komis (1931).

8) Virulenzsteigerung durch Dissoziation studierte zuerst S. A. Petroff (1929/32 zusammen mit Branch und Steenken). Nach Filtration durch Papierfilter und späterer Aussaat auf Gentianaviolett-Eier-Nährböden mit Zusatz von Natrium taurocholicum gelang es, einen BCG-Stamm in R- und S-Formen zu trennen.

Nach Petroff soll es Loewenstein, Heyman, Bocchini, Pla y Armengol gelungen sein, seine Erfahrungen zu verifizieren. Eine Bestätigung der Petroffschen Befunde geben außerdem E. A. Schnieder (1929), H. Much (1930), Begbie und Mackie (1930), Sasano und Medlar (1931), Reed (1932). Eine geringe Virulenzsteigerung erzielte R. H. Christison (1932). Demgegenüber konnte eine erhebliche Anzahl von Autoren überhaupt keinen Unterschied der Virulenz zwischen R- und S-Formen feststellen: A. Calmette (1928), M. Tzekhnovitzer (1928), E. Piasecka-Zeylandowa (1928/1931), R. Kraus (1929), R. Kraus und Gerlach (1929), L. und B. Lange (1930/32), O. Kirchner (1930), C. Praußnitz (1930/31), Nechtadimenko, Odrina, Syssak und Anguenitski (1930), T. de Sanctis Monaldi (1930), A. Saenz (1931), T. Toda (1931) u. a.

Später gelang auch Dreyer und Vollum (1931), ganz besonders aber W. Seiffert (1932) die Dissoziation hochvirulenter Varianten aus ihren BCG-Stämmen. Alle diese Versuche der Virulenzsteigerung sind nicht unwidersprochen geblieben.

Y. Watanabe teilte 1930 mit: „Guérin in his private communication to me writes, that by recultivating BCG on the routine media, it would sometimes regain its pathogenicity and especially laid stress on the necessary conditions for the preservation of BCG." — Also Guérin selbst glaubt an die Möglichkeit einer Virulenzsteigerung des BCG, wenn man ihn nicht auf den vorgeschriebenen Hungernährböden kultiviert.

Wie dem auch sei, wenn der Schöpfer der BCG-Schutzimpfung, Calmette (1930/31) selbst erklärt hat: „Es ist allerdings unmöglich, positiv zu behaupten, daß kein Laboratoriumskunstgriff imstande sei, dem BCG seine Virulenz, die er in 230 Gallekulturen ... verloren hat, wiederzugeben;" — dann dürfen wir selber nicht a priori eine Möglichkeit der Virulenzsteigerung von der Hand weisen.

Eigene Versuche.

Es sollte in den folgend beschriebenen Versuchen studiert werden, ob der BCG unter gewissen abnormen, von der Calmetteschen Schule vermiedenen Umständen seine verlorengegangene Virulenz wiedergewinnen kann. Folgende praktische Probleme sollten hierbei berücksichtigt werden:

I. Die Katastrophe in Lübeck und
a) die Erklärung Deyckes, wonach die BCG-Virulenz durch Züchtung auf Hohnschem Eiernährboden entstanden sein sollte,
b) die Erklärung Petroffs, welche eine Dissoziation in die virulente S-Form annahm,
c) die Wirkung des BCG bei tragenden Versuchstieren und die Folgen für ihre Nachkommenschaft.

II. Die seit der Entdeckung der A. Gurwitschschen mitogenetischen Strahlung festgestellte Beeinflussungsmöglichkeit des Bakterienwachstums sollte in den Dienst der Untersuchung gestellt werden, um dabei zu eruieren, ob es durch mitogenetische Bestrahlung gelingt, das langsame Wachstum der Tuberkelbakterien (BCG) zu beschleunigen und hierbei sogar eine eventuelle Virulenzsteigerung herbeizuführen.

III. Es wurde studiert, wie sich der BCG bei Reinfektion an vorher schon mit BCG vakzinierten Versuchstieren verhält. Hierbei leitete uns eine ziemlich unbekannt gebliebene Angabe von R. Kraus (1927), der bei diesem Infektionsmodus scheinbar durch Ueberempfindlichkeitsreaktionen seine Versuchstiere an generalisierter Tuberkulose zugrunde gehen sah.

Bei der Arbeit mit BCG wurden entsprechend den Forderungen A. Calmettes (1930) die strengsten Maßnahmen getroffen, die einer Verunreinigung oder Verwechselung mit virulentem Tuberkelbakterienmaterial vorbeugen sollten:

1) Die Arbeiten mit BCG wurden grundsätzlich in vor 4 Jahren erbauten Institutsräumen vorgenommen, in denen nachweislich weder Tuberkelbakterien noch Tuberkuloseversuchstiere gehalten worden waren.

2) Die Ställe für die noch ungeimpften Versuchstiere (aus eigener von eventueller, spontaner Tuberkulose freier Zucht) und die Ställe für die BCG-Versuchstiere waren in Räumen, die noch nie für Tuberkuloseversuche gebraucht worden waren und unzugänglich für Außenstehende in den hellen Kellerräumen des Institutes lagen.

3) Zur selben Zeit wurden im ganzen Institut keinerlei andere Tuberkelbakterien als BCG vorrätig gehalten.

4) Die Versuchstiere wurden, um gegenseitige Infektionsmöglichkeiten auszuschalten, in vergitterten Käfigen zu je zwei unzugänglich für Ratten gehalten.

5) Sämtliche mit der BCG-Arbeit beschäftigten Personen waren frei von klinisch nachweisbarer Tuberkulose.

6) Die zur Impfung verwendeten BCG-Kulturen wurden im Abstrich und durch Bouillonkultur auf ihre Reinheit hin kontrolliert.

7) Die an der BCG-Infektion erkrankten Tiere wurden in ihren Organen im gefärbten Ausstrich, ferner durch Passagen und Kultur, in seltenen Fällen starker pathologisch-anatomischer Veränderungen auch im histologischen Schnitt auf die Spezifität ihrer Erreger hin kontrolliert.

8) Die für die BCG-Arbeit bestimmten Geräte blieben stets in dem für sie bestimmten Raume und wurden zu anderen Arbeiten nicht benutzt.

Versuchsreihe I.

Die Pathogenität des BCG auf Sauton-, Petroff-, Petragnani- und Hohnschem Nährboden.

A. Pathogenität auf Sauton-Nährboden.

Der Stamm BCG, der vom Institut Pasteur unserem Institute für Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden war, trug die No. 397. Er wurde alsbald nach seiner Ankunft von seinem Kartoffel-Glyzerin-Nährboden ab auf Sauton-Nährboden überimpft und von dort etwa alle 2½ Wochen weitergeimpft; gleichzeitig wurden jeweils Seitenkulturen auf Eiernährböden von den Sauton-Nährböden abgezweigt.

Neben den unten näher beschriebenen Untersuchungen der auf Eiernährböden gezüchteten BCG-Typen wurden Kontrollen mit den laufend in Sauton gezüchteten BCG-Subkulturen ausgeführt: Diese wurden nach 2½ Wochen von der Oberfläche bzw. aus der Tiefe (ähnlich der Methodik von Dreyer und Vollum 1931) mit einer Schleifenöse herausgeholt, nach Trocknen auf sterilem Filterpapier gewogen und nach sorgfältiger Emulgierung (5 mg auf 1 ccm physiol. Kochsalzlösung) im Mörser (2 Min.) und im Schüttelapparat (15—60 Minuten) ganz zerkleinert.

Es wurden Dosen von 10/15 mg an 16 Versuchstiere — 8 Kaninchen (K.) und 8 Meerschweinchen (M.) — verimpft.

Dabei zeigte sich, daß zu jeder Zeit die Virulenz der auf Sauton-Nährboden gezüchteten BCG-Subkulturen so gering war, daß es nur einmal (M. 6) zu einem erbsengroßen, lokalisierten Netzabszeß kam, der wirklich eindeutig auf BCG-Infektion zurückzuführen war.

M. 1, ferner K. 10 und 12 erkrankten und starben interkurrent. Die übrigen Tiere (M. 2, 3, 4, 5, 7 und 8; K. 9, 11, 13, 14, 15) zeigten bei der Sektion keine makroskopischen Veränderungen.

Somit war die Harmlosigkeit des uns von Calmette zugesandten Stammes eindeutig erwiesen.

B. Pathogenität auf Petroff-Nährböden.

Diese Versuche wurden genau der Originalvorschrift S. A. Petroffs (1915/1930) entsprechend ausgeführt. Prof. Petroff hatte unserem Institut freundlicherweise ein haltbares Modell seiner

BCG-Varianten auf dem Spezialnährboden zugesandt. Nach diesem Muster und der Beschreibung in der Literatur wurde die Beurteilung auf R- und S-Formen vorgenommen. Wir konnten dabei — bis auf die Virulenz — die Beobachtungen Petroffs an dissoziierten Kulturen vollauf bestätigen.

Der Schutz der Petri-Schalen gegen Luftkeime erfolgte mittels Autoreifen nach Petroff, die der Quere nach zerschnitten wurden; wir waren jedoch von den Erfolgen dieser Methode arg enttäuscht. Obwohl wir die Platten mit gut sitzendem Gummi verschlossen hielten und diesen nur zur Ueberimpfung nach vorangegangener Abkühlung abnahmen, mußten wir doch bis 75 Proz. der Platten (oft sogar erst nach Monaten!) wegen Verunreinigung ausrangieren.

Beim Ueberimpfen wurde das Material besonders von der Peripherie der Kulturen genommen, da sich diese im Stadium dauernder, gesteigerter Vermehrung befindet und auch unter dem Einfluß der Umgebung und des Nährbodens mehr Chancen für das Auftreten der für die Vererbungsvorgänge wichtigen „sensiblen Perioden" (Baerthlein) aufweist. Jedoch zeigten sich zwischen diesen, aus der Zone der gesteigerten Variationsmöglichkeiten entnommenen und anderen mehr zentral entnommenen Keimen keine bemerkenswerten Unterschiede (Vgl. dazu W. Seiffert 1932). Das Material wurde dann zwischen jeder Passage durch Papierfilter filtriert und kam schließlich zur Aussaat auf Petri-Schalen. Nach Fortführung von 4 Petroff-Nährboden-Passagen hatten wir schließlich eine ausreichende Menge von R- und S-Formen isoliert. Außerdem ereignete es sich aber, daß eine Platte, die eine etwa markstückgroße S-Kolonie enthielt, an einer Ecke nach 8 Wochen auffallend stark zu wuchern anfing und dort spontan große verruköse Mengen der R-Form produzierte. Es soll hier nicht entschieden werden, ob dieser Umschlag durch wechselnde Nährboden-Feuchtigkeit, durch spontanen Uebergang und Rückschlag oder gar ungenügende Differenzierung der S-Form erklärt werden muß (C. Praußnitz, W. Seiffert, S. A. Petroff). Diese Kolonie kam als Mischform R + S zur Verimpfung.

Die Nährbodenpassage und Differenzierung der R- und S-Formen verlief folgendermaßen:

Sauton-Nährboden:		2½	Wochen
Petroff-	„	: 8	„
Petroff-	„	: 10	„
Petroff-	„	: 11	„
Petroff-	„	: 8	„

Mit dem hieraus gewonnenen Material wurden 20 Tiere subkutan, intraperitoneal und intravenös infiziert. Die Dosen variierten zwischen 5—15 mg. Die Bakterien wurden nach sorgfältigem Abwägen in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, so daß 5 mg in 1 ccm emulgiert wurden. Nach Zermörsern (R-Form $^5/_{10}$ Min., S-Form 2 Min.) und schütteln im Schüttelapparat (R-Form 1—2 Std., S-Form ½ Std.) wurde der Impfstoff an die Versuchstiere, wie es Tabelle II zeigt, verimpft. Das in Tierversuchen gewonnene Passagematerial erkrankter Organe wurde besonders unter Anwendung des

Verfahrens von Löwenstein-Sumiyoshi (1924) und J. Hohn (1926) weitergeimpft. Die erkrankten Organteile wurden mit 10proz. Schwefelsäure versetzt, emulgiert und geschüttelt. Nach 20 Min. Einwirkung wurde 5 Min. zentrifugiert und dann die Schwefelsäure sofort abgegossen. Diese Methode wurde um so mehr bevorzugt, als nach Untersuchungen L. Langes (1930) der Säurezusatz einen „Wachstums- oder Vermehrungsreiz auf Tuberkelbazillen" ausüben soll.

Die Versuchsanordnung, Passagen und die Pathogenität der R- und S-Formen sind aus Tabelle I und II ersichtlich[1]).

Die Tabellen I und II demonstrieren den schwankenden Ausfall von 20 Virulenzproben.

Sieht man ab von M. 17, das einer Pasteurella-Infektion; M. 26, das einer anderen kryptogenetischen Infektion erlag, so bleiben noch 3 Fälle, deren Tod höchst wahrscheinlich auch nicht direkt mit der BCG-Impfung zusammenhing: M. 19, das unter den Zeichen allgemeiner Kachexie zugrunde ging. Dieser Kachexietod hat wohl sicher mit der von französischen Autoren beobachteten „forme cachectisante" oder der „dénutrition progressive" nichts zu tun und ist als Zufallsbefund vielleicht konstitutioneller Ursache aufzufassen. Jedenfalls blieb das Suchen nach säurefesten Stäbchen in allen Organen erfolglos, ebenso fehlten Muchsche Granula. Auf jeden Fall wurden Passagen angelegt, um ev. präbazilläre Virusformen zu erfassen, die Passagen gingen jedoch nicht an. —Interessant ist ferner das Schicksal der beiden Kaninchen-Geschwistertiere 29 und 30, die beide in einem Käfig schon 3 Tage nach der Impfung an einer Pasteurellapneumonie zugrunde gingen. Immerhin hatte augenscheinlich die Impfung und die mit ihr verbundene Aufpfropfung von BCG-Keimen auf eine latente Pasteurellose der Lunge die plötzliche letale Erkrankung bewirkt. Wir können dabei wohl an das von A. Ascoli (1927/31) beobachtete Phänomen der Anachorese[2]) denken. Auf Grund der Erfahrungen von Hormaeche (1930), W. H. Park (1930), ferner auch von J. Lignières (1929) über BCG-Virulenzsteigerung bei Streptokokken-Mischinfektion wurde hier das Ergebnis der Passagen mit besonderem Interesse erwartet, doch diese gingen nicht an — ein Beweis für die Richtigkeit der Anachorese-Theorie Ascolis.

1) Zeichenerklärung:

M.: Meerschweinchen	×: getötet
K.: Kaninchen	θ: ohne pathologischen Befund
ip.: intraperitoneal	—: Untersuchung auf Tuberkulose negativ
iv.: intravenös	SF.: säurefeste Stäbchen
†: gestorben	sk.: subkutan

2) Anachorese (= Rückzug) ist die Miteinbeziehung von latenten Infektionserregern des Körpers in die bei der BCG-Vakzination entstehenden Tuberkel. Infolge der Abwehrreaktion und der doppelten Infektion kann es hierbei manchmal zum Tode des Tieres kommen, aber in jedem Fall wird der Körper hierbei entgiftet.

Tabelle I.

Virulenz des BCG nach Passagen auf Nährböden nach Petroff.

Tier No.	Kulturtyp	Versuchstier	Dosis BCG in mg	Applikationsmodus	Lebensdauer in Tagen	Anfangsgewicht in g	Endgewicht in g	Pathologisch-anatomischer Befund	Mikroskopischer Befund	Züchtung auf Eiernährböden nach Petroff	Tierpassage an 2 M. ip. 2 M. sk. 2 K. ip. 2 K. sk. (1 K. iv.)	Ergebnis und Bemerkungen
17	S	M.	5	ip.	131 †	300	610	einseitige, lobäre Pneumonie	Pasteurella-B.	θ	θ	interkurrent gestorben
18	S	M.	10	ip.	120 ×	260	540	θ	θ	θ	θ	nicht erkrankt
19	S	M.	5	sk.	94 †	310	350	Kachexie	—	—	—	Kachexie, Passagen neg.
20	S	M.	10	sk.	180 ×	310	710	θ	θ	θ	θ	nicht erkrankt
21	S	K.	10	iv.	42 ×	1050	1300	Lungen: ca. 6 miliare Stippchen	wenige SF.	θ	θ	geringfügige Affektion der Lunge
22	S	K.	10	iv.	104 †	1070	2450	Lungen: multiple, miliare Herde	zahlreiche SF.	+ nach 3 Woch.	—	ausgebreitete, aber nicht progrediente Lungentuberkulose, Passagen neg.
23	S	K.	10	ip.	300 ×	1400	4090	Lungen: ca. 10 miliare Herde	mäßig viel SF.	—	—	mittelgradige Affektion der Lunge, Passagen neg.
24	S	K.	10	ip.	150 ×	1290	2500	Netz, Magen, Leber: multiple bis erbsengroße Käseherde	zahlreiche SF.	+ nach 4 Woch.	†	ausgebreitete, aber nicht progrediente Abdominaltuberkulose, Passagen pos.

Tabelle I (Fortsetzung).

Tier No.	Kulturtyp	Versuchstier	Dosis BCG in mg	Applikationsmodus	Lebensdauer in Tagen	Anfangsgewicht in g	Endgewicht in g	Pathologisch-anatomischer Befund	Mikroskopischer Befund	Züchtung auf Eiernährböden nach Petroff	Tierpassage an 2 M. ip. 2 M. sk. 2 K. ip. 2 K. sk. (1 K. iv.)	Ergebnis und Bemerkungen
25	R	M.	5	ip.	86 ×	320	450	Hoden l.: Abszeß	zahlreiche SF.	+ nach 3½ Woch.	—	isolierte Hodentuberkul., Passagen neg.
26	R	M.	10	ip.	141 †	300	410	Milzschwellung	—	—	0	unspezifischer Milztumor
27	R	M.	5	sk.	92 ×	270	360	0	0	0	0	nicht erkrankt
28	R	M.	10	sk.	206 ×	310	690	0	0	0	0	3—5 Wochen nach der Impfung spezifischer Abszeß an der Impfstelle, später verheilt. Untersuchung auf SF. anfangs pos., später neg.
29	R	K.	15	iv.	3 †	960	950	Pneumonie	wenige SF. und Pasteurella-B.	—	—	unspezifische Pasteurella-Pneumonie, wohl durch die Impfung aktiviert, Passagen neg.

30	R	K.	15	iv.	3 †	1050	1060	Pneumonie	wenige SF. und Pasteurella B.	—	—	unspezifische Pasteurella-Pneumonie, wohl durch die Impfung aktiviert, Passagen neg.
31	R	K.	10	iv.	105 ×	1500	3900	Lungen: multiple, miliare Knötchen	zahlreiche SF.	+	—	ausgebreitete, aber nicht progrediente Lungentuberkulose, Passagen neg.
32	R	K.	15	ip.	291 ×	1650	4450	0	0	0	0	nicht erkrankt
33	R+S	M.	10	ip. u. sk.	185 ×	200	540	Leber: ca. 4 miliare, glasige Knötchen	wenige SF.	0	0	geringfügige Leberaffektion
34	R+S	M.	10	ip. u. sk.	210 ×	300	690	Lunge, Leber: vereinzelte nekrotische bis erbsengroße Herde	zahlreiche SF.	—	—	mittelgradige Affektion der Lungen und Leber, Passagen neg.
35	R+S	K.	15	ip. u. iv.	210 ×	1700	4900	Lungen: multiple, miliare, verkäste Knötchen	zahlreiche SF.	—	—	ausgebreitete, aber nicht progrediente Lungentuberkulose, Passagen neg.
36	R+S	K.	10	ip. u. iv.	210 ×	1650	5030	Lungen: ca. 8 miliare, verkäste Knötchen	zahlreiche SF.	—	—	geringfügige Lungenaffektion, Passagen neg.

Tabelle II.

Tierpassage ausgehend von Kaninchen No. 24.

(K. 24 infiziert mit 10 mg S-Form ip., nach 150 Tagen getötet, Anfangsgewicht: 1290 g, Endgewicht: 2500 g. Ergebnis: multiple bis erbsengroße Käseherde mit zahlreichen Säurefesten in Netz, Magen und Leber, Züchtung positiv, Passagen in 1. Generation positiv.)

Tier No.	Tierart	Organmaterial	Vorbehandlung	Dosis in ccm	Applikationsmodus	Lebensdauer in Tagen	Anfangsgewicht in g	Endgewicht in g	Pathologisch-anatomischer Befund	Mikroskopischer Befund	Züchtung auf Eiernährböden nach Petroff
37	M.	Netz	0	2	ip.	50 ×	220	390	0	0	0
38	M.	Netz	H_2SO_4	2	sk.	30 ×	240	350	Inguinaldrüse bohnengroß verkäst	zahlreiche SF.	+ nach 4 Wochen
39	M.	Leber	0	2	ip.	150 ×	250	510	0	0	0
40	M.	Leber	H_2SO_4	2	sk.	180 ×	230	600	0	0	0
41	K.	Netz	0	2,5	iv.	160 ×	570	1500	0	0	0
42	K.	Netz	H_2SO_4	5	sk.	90 ×	610	1200	0	0	0
43	K.	Leber	0	5	ip.	140 ×	530	1300	Netz: erbsengroßer Knoten	wenige SF.	—
44	K.	Leber	H_2SO_4	5	sk.	250 ×	620	3400	0	0	0

Die Passagen von M. 38 und K. 43 ließen sich nicht mehr fortführen.

Ein Vergleich der an den übrigen Tieren gewonnenen Infektionserscheinungen zeigt nun einen gewissen Unterschied in der Virulenz der R- und S-Formen. Ganz abgesehen davon, daß alle untersuchten Stämme untereinander Virulenzschwankungen zeigten, zu denen auch die Empfänglichkeit der Versuchstiere mitbeiträgt, zeigte sich doch eindeutig eine stärkere Erkrankung der Gruppe der mit S-Formen intravenös und intraperitoneal infizierten Tiere (K. 21/24). Jedoch nie kam es zu progredienter Tuberkulose, nie ging ein Tier an der Ausbreitung der Tuberkulose zugrunde und nie gelang es in Tierpassagen, die Virulenz zu erhalten oder gar zu steigern. Im Gegenteil: fast stets riß die Passage schon in der 2. Generation ab, und der eine Fall, in dem die Passage in der 2. Generation noch anging, konnte, wie Tabelle II zeigt, in der 3. Generation nicht mehr fortgeführt werden.

An den mit R-Formen geimpften Versuchstieren der Tabelle I M. 25 und K. 31 zeigten sich tuberkulöse Veränderungen nur in geringem Ausmaße, stärker waren sie schon bei den mit der Mischform (R + S) geimpften Versuchstieren (M. 33/34, K. 35/36). — M. 18, 20, 27, ferner K. 32 erkrankten überhaupt nicht; M. 28 bekam 3/5 Wochen nach der Impfung gutartige lokale Abszesse.

Zusammenfgefaßt steht im Vordergrund eine etwas größere Virulenz der S-Form gegenüber der R-Form und eine etwas größere Empfänglichkeit der Kaninchen gegenüber der S-Form.

Diese von zahlreichen anderen Autoren (R. Kraus, v. Hutyra, Hormaeche, Watson, Kirchner, Griffith, Much, B. Lange, Dreyer, Komis, Arzitia, Orellana und del Rio, Uhlenhuth und Seiffert) ebenfalls beobachtete Abweichung des BCG (als eines umgezüchteten Typus bovinus) von der Typenregel, erweckte den Verdacht der Aehnlichkeit mit dem Typus gallinaceus. Aus diesem Grunde sind auch an unserem Institute mit demselben BCG-Stamm von Dr. Callerio Fütterungsversuche an Hühnern vorgenommen worden, die enorme Mengen BCG per os erhielten; die Sektion nach über einem Jahr verlief negativ. — J. D. Aronson und C. C. Whitney (1930) haben solche Intermediärtypen allgemein als Mammaliantypus zusammengefaßt.

C. Pathogenität auf Petragnani-Nährböden.

Dieser Nährboden wurde besonders deshalb bevorzugt, weil das erstaunlich rasche Wachstum von Tuberkelbakterien auf ihm bekannt ist (s. a. W. Seiffert 1932 und die von ihm gemachte Einschränkung bei längerer Verwendung von Petragnani-Nährböden). Wir hofften durch das rasche Wachstum des BCG auch eine größere Chance für die Entwicklung variierender und virulenterer Formen zu gewinnen. Dabei wurde auch die Aufspaltung in die Petroffschen S- und R-Formen versucht, die nach Zusatz von 0,25 Proz. Natrium taurocholicum in 4 Passagen gelang.

Zum Verschluß der Petrischalen diente Paraffin, jedoch machten wir damit genau so schlechte und schlechtere Erfahrungen wie mit Gummiringen nach Petroff.

Es wurden nun mit dem BCG-Stamm Paris No. 397 folgende Nährbodenpassagen vorgenommen:

Sauton-Nährboden	:	2½ Wochen
Petragnani-Nährboden	:	8 „
Petragnani- „	:	5 „
Petragnani- „	:	3 „
Petragnani- „	:	3 „

Mit den Kulturen der angegangenen Platten wurden 16 Versuchstiere intraperitoneal, subkutan und intravenös, wie schon oben beschrieben, geimpft.

In noch stärkerem Ausmaße als bei den vorangegangenen Versuchen war hier die fast völlig fehlende Virulenz des BCG bei Dosen von 5—15 mg ersichtlich. Makroskopisch erkennbare Befunde traten nur bei 2 Meerschweinchen auf, die beide mit der

S-Sorm geimpft worden waren. Diese Befunde waren aber so harmloser Art (Netzabszeß und Leistendrüsenschwellung), daß eine Fortimpfung in Passagen nicht gelang. Immerhin trat auch hier wieder in bescheidenem Ausmaße die relativ größere Virulenz der S-Form in den Vordergrund.

Von einer Erörterung, ob der Petroffsche Nährboden die Virulenz besser zu steigern vermag als der Petragnanische (wie es hier beinahe erscheint), muß doch abgesehen werden, denn das Alter der untersuchten Kulturen war doch bei beiden Versuchsreihen grundverschieden.

D. Pathogenität auf Hohnschen Nährböden.

In Analogie zu den in Lübeck von Deycke vorgenommenen Züchtungsversuchen wurde weiterhin die Pathogenität des BCG auf Hohnschen Nährböden studiert.

Bei der Herstellung der Nährböden wurde im Anfang unserer Arbeit das alte, auch in Lübeck verwendete, später aber gleich nach Erscheinen (1931) ausschließlich das neue Hohnsche Rezept mit gewissen Modifikationen verwandt. Zwecks Differenzierung der R- und S-Formen wurde 0,25 Proz. Natrium taurocholicum hinzugefügt. Das Hämatin wurde, um die eventuelle Beimischung von Tuberkelbakterien des Typus humanus zu vermeiden, nicht aus WaR.-Cruor, sondern aus dem Blutkuchen geschlachteter, gesunder Pferde hergestellt (bezüglich der Verunreinigungsfrage des Blutes durch Tuberkelbakterien und ihrer Bedeutung für die sterilisierten Nährböden verweisen wir auf die negativen Ergebnisse L. Langes 1930 und W. Seifferts 1932).

Die Petrischalen wurden mit Plastiline verschlossen; hierbei machten wir viel bessere Erfahrungen als mit Gummiring- und Paraffinverschluß (vergl. auch W. Seiffert 1932).

Das Wachstum des BCG erfolgte auf diesen Nährböden auffallend schnell, so daß man schon nach ca. 3 Wochen größere Kolonien herausgezüchtet hatte. Diese wurden dann mit dem Ziel der Variantenaufspaltung in R- und S-Formen auf Hohnschen Platten weitergeführt. Die Nährbodenpassagen gestalteten sich folgendermaßen:

Sauton-Nährboden	:	2½	Wochen
Hohn- ,,	:	4	,,
Hohn- ,,	:	3	,,
2mal „Z“- ,,	:	á 3	,,

Mit den in der 4. Nährbodenpassage nach Hohn gewonnenen R- und S-Formen wurde nun die Virulenzprüfung an 16 Versuchstieren vorgenommen. Die Versuchsanordnung geht aus Tabelle III hervor.

Bei den beiden Kaninchen (K. 65 und 68) ist noch der Verlauf der Passagen von Interesse: die Passagen von K 65 gingen besonders

nach Schwefelsäurebehandlung des Organmaterials an, bei den Passagen von K. 68 wurde neben der Schwefelsäurehomogenisierung noch die Antiforminanreicherung unter späterem Hinzufügen von Sand als Reizstoff bei der Injektion probiert, jedoch ohne besonderen Erfolg.

Auf den ersten Blick überrascht in der Tabelle III die außerordentlich hohe Virulenz der S-Form, insbesondere bei intravenöser Anwendung an Kaninchen. Die mit der S-Form infizierten Meerschweinchen (M. 61/64) zeigten durchweg gutartige, lokalisierte Prozesse; im Gegensatz dazu stehen die Kaninchen (K. 65/68); sie starben alle nach etwa $2^1/_2$ Monaten an den Folgen einer schweren miliaren Tuberkulose, deren Ursprung in der Lunge lag, da diese bei dem intravenösen Impfmodus als erstes und optimales Filter für die recht hohen BCG-Dosen eintrat.

Im krassen Gegensatz zu diesen 4 Exemplaren einer tödlich verlaufenden miliaren Lungentuberkulose steht nun wieder das Ergebnis der Passagen; von diesen gingen überhaupt nur 2 Passagereihen an! Die Organbefunde der 2. Passagereihen waren aber bereits so geringfügig und lokal begrenzt, daß eine 3. Passagengeneration gar nicht mehr zu erzielen war. Wir müssen diese Tatsache wieder als einen Beweis für den trotz allem benignen Charakter der beobachteten Lungenprozesse ansehen und glauben, daß die Versuchstiere die Infektion selbst hätten überwinden können, wenn durch die Lungenanschoppung nicht eine tödliche Kreislaufstörung eingetreten wäre. Der Körper selbst hatte die etwas gesteigerte Virulenz dieser S-Varianten scheinbar schon überwunden — das beweist der Ausfall der Passagen — aber er war an der eigenen Reaktion zugrunde gegangen.

Im Vergleiche hierzu sei an die Anachorese-Versuche Ascolis erinnert, der 1930 über ähnliche Erfahrungen (Tod der Versuchstiere nach intravenöser Applikation von BCG an scheinbar miliarer Lungentuberkulose) berichtet und den hieraus gewonnenen Eindruck treffend mit einer „Vogelscheuche" vergleicht; denn der Befund ist bei aller Eindringlichkeit der Präparate relativ harmlos; eine Uebertragung in Passagen gelingt nicht.

Auf der anderen Seite dokumentiert das Verhalten der mit der R-Form geimpften Versuchstiere (Tabelle III No. 69/76) wieder schlagartig die Harmlosigkeit des BCG, wie sie allen Anhängern Calmettes immer wieder aufgefallen ist. Sieht man von den beiden interkurrent an Staphylomykose und Kokzidiose gestorbenen

Tabelle III.

Virulenz des BCG nach Passagen auf Nährböden nach Hohn.

Tier No.	Kulturtyp	Versuchstier	Dosis BCG in mg	Applikationsmodus	Lebensdauer in Tagen	Anfangsgewicht in g	Endgewicht in g	Pathologisch-anatomischer Befund	Mikroskopischer Befund	Züchtung auf Eiernährböden nach Petroff	Tierpassage an 2 M. ip. 2 M. sk. 1 K. iv. 1 K. ip. 2 K. sk.	Ergebnis und Bemerkungen
61	S	M.	4	sk.	180 ×	355	610	Inguinaldrüse d. Impfseite kl. bohnengroß geschwollen	vereinzelte SF.	—	θ	regionäre Lymphdrüse erkrankt
62	S	M.	6	ip.	70 †	315	46	Leber, Milz, Netz: zahlreiche linsengroße verkäste Herde	zahlreiche SF.	+ nach 6 Wochen	—	spezifische Affektion von Leber, Milz und Netz, Passagen negativ
63	S	M.	8	ip.	152 †	330	620	Metritis ulcerosa, Milzschwellung	Uterus: wenige SF. Milz: keine SF.	—	–	isolierte Tuberkulose des Uterus, Passagen neg.
64	S	M.	10	ip.	180 ×	375	710	Leber: Mesenterium ca. 6 erbsengroße verkäste Knoten	viele SF.	+ nach 5 Wochen	—	Leber u. Bauchfell leicht erkrankt, Passagen neg.
65	S	K.	10	iv.	70 †	1600	2100	Lunge: floride, miliare Tuberkulose, Milzschwellung	Lunge: viele SF. Milz: wenige SF.	+ nach 6 Wochen	+	floride, miliare Lungentuberkulose mit Aussaat, nachgewiesen in der Milz, andere Organe o. B., Passagen positiv

66	S	K.	12	iv.	80 †	2050	2550	Lunge, Leber: floride, miliare Tuberkulose, Milzschwellung	Lunge: viele SF. Leber: viele SF. Milz: viele SF.	+ nach 7 Wochen	—	floride, miliare Tuberkulose mit Aussaat, nachgewiesen in Lunge, Leber und Milz, andere Organe o. B., Passagen negativ
67	S	K.	14	iv.	74 †	2650	3200	Lunge: floride, miliare Tuberkulose, Leber: fettige Degeneration, Milzschwellung	Lunge: massenhaft SF. Leber: massenhaft SF. Milz: keine SF.	+ nach 6 Wochen	—	floride, miliare Tuberkulose mit Aussaat, nachgewiesen in Lunge und Leber, andere Organe o. B., Passagen negativ
68	S	K.	16	iv.	78 †	3270	3930	Lunge: floride, miliare Tuberkulose, Leber: ca. 4 miliare Herdchen	Lunge: zahlreiche SF. Leber: zahlreiche SF.	+ nach 6 Wochen	+	floride, miliare Lungentuberkulose, geringe Affektion der Leber, Passagen positiv
69	R	M.	4	iv.	150 ×	210	450	0	0	0	0	nicht erkrankt
70	R	M.	6	iv.	152 ×	300	530	0	0	0	0	nicht erkrankt
71	R	M.	8	ip.	80 †	390	550	Milzschwellung	Staphylokokken	0	0	interkurrent erkrankt und gestorben
72	R	M.	10	ip.	180 ×	345	670	0	0	0	0	nicht erkrankt
73	R	K.	10	iv.	179 ×	1050	2300	0	0	0	0	nicht erkrankt
74	R	K.	12	iv.	53 †	1500	1940	Leber, Darm: ca. 5 abgekapselte, verkäste Herde	Kokzidien	0	0	interkurrent erkrankt und gestorben
75	R	K.	14	iv.	200 ×	1990	5400	0	0	0	0	nicht erkrankt
76	R	K.	16	ip.	250 ×	2530	6700	0	0	0	0	nicht erkrankt

Tieren (M. 71 und K. 74) ab, so kann man sagen, daß alle mit R-Stämmen geimpften Versuchstiere, selbst nach der respektablen Dosis von 16 mg BCG intravenös, gesund geblieben sind!

Auch hier fällt (wie oben bei den auf Petroffschen Nährböden gezüchteten Stämmen) auf, daß die S-Form für Meerschweinchen wenig pathogen, für Kaninchen aber stärker pathogen ist. Ein solcher intermediärer Stamm würde nach unserer Typeneinteilung eher einem Typus gallinaceus als einem Typus bovinus entsprechen. Dies beweist wieder nachdrücklich die These, daß man an einem atypisch gezüchteten Stamm nicht die Typenzugehörigkeit durch Versuchstiere festlegen kann; entscheidend ist eben die individuelle Wirkung eines Stammes am Menschen, bzw. am Rinde oder am Huhn.

Versuchsreihe II.

Die Virulenz mitogenetisch bestrahlter BCG-Stämme auf Petroffschen Nährböden.

Die auf den Petroffschen Nährboden beobachtete mäßige Virulenz des BCG einerseits, und die lange Wachstumsdauer andererseits ließen den Wunsch aufkommen, eine Methodik zu suchen, die beide Eigenschaften ändern könnte. Als solche wurde nunmehr die mitogenetische Bestrahlung nach A. Gurwitsch studiert.

Gurwitsch hat als erster festgestellt und zahlreiche Nachprüfer haben seine Ergebnisse bestätigt, daß bei der Vermehrung von Zellen aller Art eine der Ultraviolettstrahlung nahestehende Strahlenaussendung auftritt, die auch andere Zellen zu beschleunigter Vermehrung anregt (s. d. Darstellung von A. und L. Gurwitsch 1932). Auch beim Wachstum von Bakterien läßt sich der mitogenetische Bestrahlungseffekt nachweisen (s. L. Ács 1931). Wir haben nunmehr die Wirkung der mitogenetischen Induktion am BCG untersucht.

Versuchstechnik: Die Petroffschen Nährböden wurden nach dem oben erwähnten Rezept hergestellt und in Miniatur-Petrischalen (4,5 cm Durchm.) von gewöhnlichem Glas bis nahe an den oberen Rand ausgegossen; hierauf wurden die BCG-Stämme gezüchtet. Der Verschluß erfolgte mit Quarzglasdeckeln von 5 cm Durchm., die umgekehrt (also die Seitenflächen nicht abwärts, sondern aufwärts gerichtet) auf die Petrischälchen aufgesetzt und mit Plastiline fest verkittet wurden. Diese wurden nun im Brutschrank aufbewahrt und stets darin belassen. Täglich einmal wurde aber auf die nach oben gerichteten Quarzdeckel eine bis oben gefüllte kleine Agar-Petrischale aus gewöhnlichem Glas gesetzt, die mit Colibakterien frisch beimpft war. Diese Schale sollte also im Verlaufe ihrer 24stündigen Vermehrung als Sender mitogenetische Strahlen

durch den Quarzdeckel hindurch auf die etwa ½ cm entfernte BCG-Petrischale als Empfänger werfen. Die Nährbodenpassage wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt:

Sauton-Nährboden	:	2½ Wochen,	
Petroff- „	:	10 „	,
Petroff- „	:	9 „	,
Petroff- „	:	11 „	mitogenetisch bestrahlt,
Petroff- „	:	12 „	mitogenetisch bestrahlt.

Nach Ablauf dieser Zeit war eine hinreichende Differenzierung von R- und S-Formen eingetreten.

Das Ergebnis enttäuschte arg etwaige in diese Methode der Wachstumsbeschleunigung gesetzte Erwartungen: Das Wachstum der auf Petroff-Nährboden mitogenetisch bestrahlten BCG Stämme dauerte länger als bei den entsprechenden unbestrahlten Kontrollen (12 Wochen gegenüber 8 Wochen). Die Virulenz der so gezüchteten R- und S-Formen zeigt Tabelle IV.

Aus Tabelle IV ist zweifelsohne erkenntlich, daß die mitogenetische Bestrahlung der Petroff-Kulturen eher die Virulenz des BCG hat vermindern statt erhöhen können. Wieder zeigen die S-Formen in gewissen Grenzen eine größere Virulenz als die R-Formen, besonders bei den Kaninchen (K. 108 und 111), weniger bei den Meerschweinchen (M. 105 und 107). Jedoch in keinem Falle gelang es, bei den bestrahlten Kulturen so ausgedehnte tuberkulöse Veränderungen zu erzielen, wie bei den unbestrahlten. Es liegt nahe, diese Differenz auch durch das verschiedene Alter der Kulturen — hier 12 Wochen, in den obigen Versuchen 8 Wochen — zu erklären; denn eine alte Kultur enthält pro mg naturgemäß mehr abgestorbene Erreger als eine junge Kultur. Wir können also sagen, daß es uns durch mitogenetische Bestrahlung nicht gelungen ist, die Vermehrungsgeschwindigkeit und Virulenz des BCG zu beeinflussen.

Worauf die hier berichteten Fehlergebnisse bei der mitogenetischen Induktion des BCG zurückgeführt werden müssen, ist schwer zu sagen; drei Gesichtspunkte sind möglich:

1) Es ist nicht jede Quarzlamelle gleich gut für die minimalen Intensitäten des mitogenetischen Ultravioletts durchlässig (Gurwitsch). Daher ist bei exakter Versuchsanordnung eine mitogenetische Kontrolle auszuführen, wofür jedoch Spezialeinrichtungen nötig sind. Wir glauben aber, daß das von uns benutzte sogenannte Bergkristall-Quarzglas bester Qualität den Anforderungen auf Durchlässigkeit für mitogenetische Strahlen hinreichend Genüge leisten konnte.

Tabelle IV.

Virulenz von mitogenetisch bestrahltem BCG auf Petroff-Nährböden.

Tier No.	Kulturtyp	Versuchstier	Dosis BCG in mg	Applikationsmodus	Lebensdauer in Tagen	Anfangsgewicht in g	Endgewicht in g	Pathologisch-anatomischer Befund	Mikroskopischer Befund	Ergebnis und Bemerkungen
96	R	M.	4	ip.	150 ×	240	460	θ	θ	nicht erkrankt
97	R	M.	6	ip.	152 ×	300	590	θ	θ	nicht erkrankt
98	R	M.	8	ip.	60 †	420	540	Bronchopneumonie mit Abszedierung	Streptokokken	interkurrent erkrankt und gestorben
99	R	M.	10	ip.	149 ×	450	650	θ	θ	Abort; nicht erkrankt
100	R	K.	15	ip.	102 †	750	1500	Femurspontanfraktur	—	interkurrent erkrankt und gestorben
101	R	K.	15	iv.	159 ×	725	1650	θ	θ	nicht erkrankt
102	R	K.	15	ip.	162 ×	770	1800	θ	θ	nicht erkrankt. Partus
103	R	K.	15	iv.	160 ×	680	1610	θ	θ	nicht erkrankt
104	S	M.	5	iv.	155 ×	240	440	θ	θ	nicht erkrankt
105	S	M.	5	sk.	153 ×	250	490	reg. Inguinaldrüse sklerosiert, kleinbohnengroß	—	geringfügige regionale Lymphdrüsenaffektion
106	S	M.	10	ip.	156 ×	245	510	θ	θ	Partus; nicht erkrankt
107	S	M.	10	sk.	150 ×	260	540	reg. Inguinaldrüse verkäst, erbsengroß	wenige SF	mäßigst. regionale Lymphdrüsenaffektion. Abort.
108	S	K.	10	iv.	152 ×	480	1060	Lunge: ca. 10 glasige, miliare Knötchen	wenige SF	geringfügige lokale Lungenaffektion
109	S	K.	15	iv.	140 ×	510	1100	θ	θ	nicht erkrankt
110	S	K.	20	ip.	135 ×	560	1020	Leber: zahlreiche stecknadelkopfgroße nekrotische Herde	—	Nekroseherde in der Leber von zweifelhafter Aetiologie
111	S	K.	25	ip.	172 ×	525	1190	Netz: 3 erbsengroße verkäste Abszesse	wenige SF	Abszedierung an der Einstichstelle im Netz

2) Es ist nach Gurwitsch der Erfolg einer mitogenetischen Induktion von der Entfernung der als Induktor wirkenden Strahlenquelle von dem zu bestrahlenden Detektor abhängig. Diese Distanz wurde in unseren Versuchen auf ein Minimum von 5 mm herabgedrückt, so daß nach dieser Richtung kaum eine Fehlerquelle zu erwarten wäre.

3) Es ist von der Gurwitzschschen Schule auf das Phänomen der mitogenetischen Depression hingewiesen worden. Demnach soll in manchen Fällen (besonders nach überdosierter Bestrahlung) eher eine Hemmung als eine Beschleunigung des Wachstums auftreten. Daß dieses Phänomen sich auch summieren kann, wenn man fortgesetzt mitogenetisch induzierend reizt, ist von Frank, ferner von Salkind beschrieben worden. Es hat sich gezeigt, daß es nicht etwa die intensivsten Strahlenquellen sind, die die stärksten Effekte zustande bringen, sondern das Optimum liegt bei einem Mittelwert, bei dem einerseits die Strahlung noch den Empfänger induziert, andererseits aber ihre depressive Wirkung bei Dauerinduktion nicht hervortritt. Zur Erklärung dieser Tatsache dürfte wohl die Vorstellung genügen, daß eine physiologische Reizschwelle besteht, unterhalb derer die Zellen auf Bestrahlung mit vermehrter Teilung reagieren und oberhalb derer sie durch zu starke Stimulation erschöpft werden. Bedenkt man ferner, daß ein depressiver Effekt tatsächlich schon nach 2 Minuten Bestrahlung auftreten kann, so wird sofort klar, daß die hier verwendete Technik der protrahierten Bestrahlung, die bewußt aus äußeren Gründen angewandt wurde, um auf einen an sich sehr vermehrungsträgen Erreger einzuwirken, zu schlechten Vermehrungs- und Wachstumsbedingungen der BCG-Kulturen führen konnte. Gurwitsch betont auch die Bedeutung der Fortpflanzung eines durch die Strahlung hervorgerufenen Erregungszustandes, der, sich innerhalb der bestrahlten Kultur übertragend, immer neue jugendliche Zellen induziert (Mutoinduktion) und in der Folge zum „mitogenetischen Aufflammen" derselben führt. So fungieren diese jugendlichen induzierten Zellen nunmehr als Sekundärstrahler. Eine Induktion aller Zellen einer Kultur durch einen Sender von außen ist jedoch nicht möglich, weil die ultravioletten mitogenetischen Strahlen nur ein geringes Penetrationsvermögen gegenüber den Zellschichten besitzen. Ist aber der Zellvorrat, wie bei den sich langsam vermehrenden Tuberkelbakterien, erschöpft, so muß auch die mitogenetische Sekundärstrahlung versagen. L. K. Wolff und G. Ras kommen 1932 auch zu dem Ergebnis, daß eine lange Bestrahlung nach anfänglicher Beschleunigung zu einem Stillstand der Vermehrung führt, „nach einiger Zeit vermehren sich die Bakterien jedoch wieder, obwohl die Bestrahlung andauert".

Die in dieser Versuchsreihe infizierten Tiere wurden im Gegensatz zu den anderen Versuchstieren während der ganzen Beobachtungszeit in gemeinsamen Käfigen gehalten. Von Interesse sind nun die bei dieser Gelegenheit gemachten Studien über die Wirkung der BCG-Impfung auf die Nachkommenschaft der Tiere, die (zufälligerweise) nach der Impfung belegt wurden.

1 Meerschweinchen (M. 106), das nach der respektablen Dosis von 10 mg BCG-S-Form ip. gesund geblieben war, warf im Verlaufe von 156 Tagen 2 Junge,

die sich späterhin als gesund und lebensfähig erwiesen. Ebenso warf eine Kaninchenmutter (K. 102), die mit 15 mg BCG-R-Form ip. geimpft worden war, im Verlaufe von 162 Tagen 5 gesunde und kräftige Junge. Im Gegensatz dazu stehen Erfahrungen, die wir an einem Meerschweinchen (M. 99) machten, das 10 mg BCG-R-Form ip. erhalten hatte und im Verlaufe von 149 Tagen ein totes Junges warf. Ebenso warf auch 1 Meerschweinchen (M. 107) nach Applikation von 10 mg BCG-S-Form im Verlaufe von 150 Tagen 3 tote Junge.

Wenn die geringe Zahl von 4 graviden Tieren auch keine eindeutig bindenden Schlüsse über einen eventuellen Schaden der BCG-Impfung für die Nachkommenschaft erlaubt, so gestattet sie doch zum mindesten die Aussage, daß 50 Proz. der Tiere bei massiver BCG-Infektion ganz gesunde Junge zur Welt haben bringen können. Also ist immerhin hier auf dem Wege über die Nachkommenschaft der Nachweis für die relative Geringfügigkeit der BCG-Infektion, selbst bei Verwendung großer Dosen, wiederum erbracht. Andererseits scheint es doch, daß mancher Organismus hierauf empfindlicher reagiert, denn spontanes Verwerfen wurde, außer bei den BCG-Tieren, in unserem Tierbestande sonst kaum beobachtet. Sicher ist, daß die Gravidität auf den Verlauf der BCG-Infektion bei den Elterntieren keinen nachteiligen Einfluß gehabt hat; Aehnliches berichten auch L. Lange und K. W. Clauberg (1928), ferner P. Nélis und E. Picard (1930/1), A. Saenz (1931).

Versuchsreihe III.

Die Virulenz des BCG bei Reinfektionsversuchen.

Die folgenden Versuche wurden ursprünglich unter dem Eindruck der finanziellen Not der Zeit aus Sparsamkeitsgründen an Versuchstieren ausgeführt, die von Dr. Callerio an unserem Institute früher mit BCG-Material infiziert worden waren, jedoch in der Folge keine nennenswerte Reaktion darauf gezeigt hatten. Diese Versuchstiere erhielten nun später noch einmal von uns mäßig hohe Dosen von BCG-Kulturen und wurden dann bald darauf getötet. Bei den nachstehend beschriebenen Versuchen liegen Infektion und Reinfektion zeitlich so weit auseinander, daß die Reinfektion, was allergische Umstimmung anbetrifft, eher auf einen immunen und anergischen als auf einen sensibilisierten Organismus traf. Daß dem nicht immer so ist, geht aus Versuchen von R. Kraus hervor, der, bei der nach Monaten erfolgten Nachimpfung von BCG-infizierten Meerschweinchen, Fälle von generali-

sierter Tuberkulose beobachtet haben soll. Für die Reinfektionsversuche wurden die Ueberreste der oben bereits ausführlich beschriebenen Petroff-, Petragnani- und Hohn-Nährböden verwendet. Die Versuchsanordnung zeigt Tabelle V.

Wenn schon die ersten 6 Längsspalten der Tabelle V den negativen Ausfall der von Callerio durchgeführten Virulenzproben und ihrer Passagen beweisen, so zeigt der zweite Teil der Tabelle, der die nach durchschnittlich $\frac{1}{4}$—$\frac{1}{2}$ Jahr vorgenommenen Reinfektionsversuche wiedergibt, deutlich die geringe Virulenz des BCG. (Die Kontrollen an nicht vorbehandelten Tieren sind in Tabelle I und III enthalten.) Ein Vergleich mit letzteren Tabellen zeigt, daß die hier verwendeten Kulturen bei der Reinfektion noch geringere Läsionen bewirkten als bei der Erstinfektion.

Bezüglich der Petragnani-Kulturen demonstrieren das in Tabelle V die Versuchstiere M. 806, 927, 5, 849; K. 805 erkrankte leider interkurrent. Auch bei den mit BCG von Petroffschen Nährböden infizierten Versuchstieren M. 782, 3, 23, 248, 942, 933, 32, K. 816, 929 ist eine geringere Durchschnittsvirulenz als in Tabelle I erkennbar; M. 22 erkrankte leider interkurrent. Von diesen Ergebnissen der Tabelle V weichen die mit Hohnschen Kulturen reinfizierten Versuchstiere doch erheblich ab: M. 815 war mit einer Mischung BCG-infizierter Organe sk. vorbehandelt worden, M. 980 hatte BCG von Sauton-Nährboden vorher intraperitoneal erhalten; bei intraperitonealer Nachinfektion mit Hohnscher BCG-Kultur zeigte sich bei beiden Tieren in den Lungen eine hämatogen ausgebreitete, miliare Tuberkulose neueren Datums mit zahlreichen Säurefesten. Wir müssen die Ursache dieser ziemlich erheblichen Läsionen, deren Passagen aber negativ verliefen, in der Virulenz der auf Hohnschen Nährböden gezüchteten Stämme suchen, die zudem noch auf besonders sensible Versuchstiere verimpft wurden. Die bei den Meerschweinchen M. 25, 995 und 986 erhobenen Befunde sind irrelevant.

Zusammenfassend läßt sich also auf Grund vorstehender Versuche feststellen, daß die an und für sich recht geringe Virulenz des BCG bei Reinfektion nach $\frac{1}{4}$—$\frac{1}{2}$ Jahr bei Meerschweinchen (und wohl auch bei Kaninchen) im allgemeinen noch weniger als sonst zu Läsionen führt, wie es auch den Erfahrungen des Kochschen Grundversuches entspricht.

Diesen Ergebnissen ist nachzutragen, daß in einigen Fällen besonders starken Lokalbefundes, insbesondere bei den Lungenpräparaten der Kaninchen (K. 22, 35 der Tabelle I und K. 65/68 der Tabelle III) die histologische Untersuchung der aufbewahrten Präparate vorgenommen wurde. Das Ergebnis war durchweg das gleiche: Lymphozyten, Epitheloidzellen, Leukozyten, spärliche Riesenzellen. Letztere fehlten in manchen Schnitten vollständig und waren selbst bei mehrfacher Schnittführung und wiederholter Präparatdurch-

Ta-

Virulenz von BC G-Kulturen

Tier No. nach Callerio	Versuchstier	Primärinfektion (Callerio)				Reinfektion			
		Infektionsmaterial	Dosis	Applikationsmodus	Tieranfangsgewicht	nach Tagen	Tiergewicht in g	Dosis BCG in mg	Kultur auf Nährböden
805	K.	verkäster Lymphknoten	5 ccm	sk. ip.	500	125	2050	10	Petragnani
806	K.	verkäster Lymphknoten	5 ccm	sk. ip.	500	125	2300	10	Petragnani
927	M.	verkäster Lymphknoten	5 ccm	sk.	220	127	530	5	Petragnani
5	M.	verkäster Lymphknoten	5 ccm	sk.	200	125	660	10	Petragnani
849	M.	verkäster Lymphknoten	5 ccm	sk. ip.	220	137	560	10	Petragnani
782	M.	verkäster Lymphknoten	5 ccm	sk. ip.	250	138	530	10	Petroff
3	M.	verkäster Lymphknoten	5 ccm	sk.	250	157	720	10	Petroff
22	M.	miliare Lungentuberkel	5 ccm	sk. ip.	250	116	590	10	Petroff
23	M.	miliare Lungentuberkel	5 ccm	sk. ip.	320	116	560	5	Petroff
816	K.	miliare Lungentuberkel	5 ccm	sk. ip.	850	127	2050	10	Petroff
25	M.	miliare Lungentuberkel und verkäste Lymphknoten	5 ccm	sk. ip.	320	144	625	10	Hohn
995	M.	miliare Lungentuberkel und verkäste Lymphknoten	5 ccm	sk.	350	136	590	10	Hohn
815	M.	Lymphknoten, Milz und Leber	5 ccm	sk.	300	136	565	10	Hohn
986	M.	Lymphknoten, Milz und Leber	5 ccm	sk.	190	159	650	10	Hohn

belle V.
in Reinfektionsversuchen.

Kulturtyp	Applikationsmodus	Lebensdauer in Tagen	Tierendgewicht in mg	Pathologisch-anatomischer Befund	Mikroskopischer Befund	Ergebnis und Bemerkungen
R	iv.	76 †	3040	Peritonitis serofibrinosa	Colibakterien	interkurrent erkrankt und gestorben
S	iv.	110 ×	3950	0	0	nicht erkrankt
S	ip.	122 ×	710	0	0	nicht erkrankt
R	ip.	115 ×	790	0	0	nicht erkrankt
S	ip.	120 ×	750	0	0	nicht erkrankt
S	ip.	118 ×	690	Netz: erbsengroßer, verkäster Herd	vereinzelte SF.	lokale Reaktion am Netz
R	ip.	129 ×	800	0	0	nicht erkrankt
S	ip.	6 †	610	Peritonitis gangraenosa	Mischinfektion	interkurrent erkrankt und gestorben
R	ip.	115 ×	710	0	0	nicht erkrankt
S	sk.	120 ×	3090	reg. Leistendrüse bohnengroß geschwollen	keine SF.	lokale Reaktion der Inguinaldrüse
R	ip.	102 ×	690	0	0	nicht erkrankt
R	ip.	68 †	650	Cystitis purulenta et calculosa (bohnengroßer Stein)	keine SF.	interkurrent erkrankt und gestorben
S	ip.	105 ×	680	Lunge, Leber: zahlreiche harte, miliare Herde	zahlreiche SF.	ausgebreitete, gutartige Affektion d. Lunge und Leber
R + S	ip.	105 ×	740	0	0	nicht erkrankt

Tabelle V

Tier No. nach Callerio	Versuchstier	Primärinfektion (Callerio)				Reinfektion			
		Infektionsmaterial	Dosis	Applikationsmodus	Tieranfangsgewicht	nach Tagen	Tiergewicht in g	Dosis BCG. in mg	Kultur auf Nährböden
980	M.	Sautonkultur nach 3 Wochen	6 mg	ip.	290	122	560	10	Hohn
248	M.	Sautonkultur 5 Min. erhitzt	6 mg	ip.	230	232	700	10	Petroff
942	M.	Kartoffel-Sautonkultur nach 2 Mon.	5 mg	sk.	250	148	550	10	Petroff
933	M.	Kartoffel-Sautonkultur nach 2 Mon.	5 mg	sk.	310	160	530	10	Petroff
37	M.	Petroffkultur R-Form nach 10 Wochen	10 mg	sk.) ip.)	250	122	510	10	Petroff
979	K.	Petroffkultur S-Form nach 12 Wochen	10 mg	iv.	1400	118	3640	10	Petroff

musterung in manchen Fällen nicht nachweisbar, in denen der Bakteriennachweis mühelos gelang; auch die Verkäsung war durchaus nicht in allen Fällen anzutreffen, besonders bei älterem Infekt.

Das Vorhandensein der typischen Riesenzellen ist bei der Tuberkulose durchaus nicht von entscheidender nosologischer Bedeutung, wie Sabin, Doan und Forkner (1930) zeigten, denn man kann schon ohne Tuberkelbakterien, allein durch ihre Lipoidextrakte, typische Tuberkel erzeugen. Eine Arbeit R. Jaffés (1914/24), die leider unbekannt geblieben ist, hat diese Tatsache schon an Chloroformextrakten ausdrücklich hervorgehoben. Andererseits findet man auch bei Lepra, Lues, Sporotrichose, Blastomykose, Leishmaniose, Aktinomykose und Trichophytie histologische Tuberkel (Jadassohn 1927).

Besprechung der Ergebnisse.

Ueberblicken wir die auf Petroff-, Petragnani- und Hohn-Nährboden, ferner die bei Anwendung mitogenetischer Bestrahlung und der Reinfektion gewonnenen Ergebnisse, so ist festzustellen, daß die Virulenz des BCG durch Dissoziation auf Petroff- und

(Fortsetzung).

Kulturtyp	Applikationsmodus	Lebensdauer in Tagen	Tierendgewicht in g	Pathologisch-anatomischer Befund	Mikroskopischer Befund	Ergebnis und Bemerkungen
R + S	ip.	119 ×	740	Lunge: miliare Tuberkel Netz: bohnengroßer Herd	zahlreiche SF.	ausgebreitete, gutartige Affektion von Lunge u. Netz
R + S	ip.	90 ×	745	θ	θ	nicht erkrankt
R + S	ip.	110 ×	660	Peritoneum: erbsengroßer Abszeß an der Einstichstelle	keine SF.	lokale Reaktion am Peritoneum
R	ip.	114 ×	680	θ	θ	nicht erkrankt
R	ip.	123 ×	670	θ	θ	nicht erkrankt
S	sk.	117 ×	6010	Lunge: ca. 10 alte miliare Herde	wenig SF.	geringe Herdbildung in der Lunge, wahrscheinlich von dem Primärinfekt her

Hohnschen Nährböden mit Natrium taurocholat in gewissen Grenzen gesteigert werden konnte. Es gelang wohl, durch massive Dosen (10—15 mg der S-Form) bei Kaninchen — weniger bei Meerschweinchen — eine tödlich verlaufende Impftuberkulose zu erzeugen, aber die Virulenz dieser Stämme war nur wirksam bei massiven Impfdosen, intravenöser Applikation und geeigneten Tieren, insbesondere Kaninchen. Eine Fortführung oder gar Steigerung dieser Befunde in Tierpassagen mißlang.

Aehnliche Ergebnisse erhielten auch R. Kraus (1927/8), M. J. Kuhn (1927), H. Selter und W. Blumenberg (1927), M. Tzeknovitzer (1927/8), F. Gerlach (1927/8), A. Ascoli (1927/31), W. Silberschmidt (1928), B. Lange und K. Lydtin (1928), W. H. Park (1930) u. a. bei Verimpfung großer Dosen BCG intravenös. Die spezielle Virulenzsteigerung durch den Hohnschen Nährboden wird in gewissem Umfange auch von C. Praußnitz (1930/1) anerkannt, von A. Saenz (1931) jedoch abgelehnt. R. H. Christison hat (1932) wie wir eine „etwas höhere Virulenz" der S-Form feststellen können, ihre absolute Virulenzsteigerung gelang auch ihm nicht.

Wenn wir bisher auch nicht eindeutig die Methoden in der Hand haben, vermittels derer eine Steigerung der Virulenz in vitro mit Sicherheit gelingt, so ist doch zu sagen, daß die bisher von anderen Autoren (s. o.) berichteten Fälle der Virulenzsteigerung uns durchaus beweisend erscheinen, wenn sie auch nicht immer reproduzierbar waren. Jedoch stellen die von uns auf Hohnschem Nährboden unter Zusatz von Natrium-taurocholat gewonnenen Ergebnisse schon eine gewisse Uebergangsform, ein Bindeglied zwischen dem sicher harmlosen Calmetteschen Originalstamm und den von Petroff, Seiffert, Dreyer und Vollum u. a. gezüchteten virulenten Varianten dar.

Im Gegensatz dazu müssen wir daran festhalten, daß der BCG in nicht zu großen Dosen, unverändert wie er von Calmette geliefert und bei Kindern appliziert wird, keine pathologischen Schädigungen auslöst. Wer aber vermag zu ahnen, unter welchen späteren Bedingungen eines Tages doch einmal die BCG-Depots eines Kindes anfangen zu wuchern, bis es zur Bakteriämie kommt?

Kirchner sagte 1930 auf dem 7. Kongreß der Internationalen Vereinigung gegen die Tuberkulose, man könne mit Hinblick auf unbekannte Entwicklungs- und Vermehrungsformen des Tuberkelbakterium „heute weniger denn je mit Bestimmtheit voraussagen, was aus einem in den lebenden Körper eines Menschen oder Tieres gebrachten Tuberkelbazillus schließlich werde". — Dasselbe beweist auch am BCG eindringlich die von Uhlenhuth und Seiffert beschriebene Virulenzsteigerung beim Meerschweinchen 1¼ Jahr nach erfolgter Impfung. — Es ist sicherlich richtig, wenn Petroff betont, daß man BCG-Tiere 1½ Jahre und länger leben lassen muß, wenn man die Frage mit Sicherheit entscheiden will, ob eine Impfung den Tod des Tieres herbeizuführen vermag. — Die von Dr. Callerio an unserem Institute angefangenen BCG-Tierversuche, die von uns beendet worden sind, sind über 1½ Jahr beobachtet worden. Auch hier war keine Virulenzsteigerung feststellbar, wie Callerio noch andernorts mitteilen wird.

Wir kommen daher bezüglich der Virus-fixe-Eigenschaften zu folgendem Schluß: Es gibt Immunisierungsverfahren, wie z. B. die Lyssa- und die Pockenschutzimpfung, bei denen ein Virus fixe verimpft wird, von dem man erfahrungsgemäß weiß, daß es zu einer leichten Reaktion des Körpers führt, welche schließlich mit der Eliminierung der Erreger und der Produktion von heilsamen Antikörpern endet (Immunisation). Anders sind die bei der BCG-Vakzination gemachten Voraussetzungen: Es soll zur Bildung kleiner harmloser BCG-Depots im Körper kommen, deren ständige Gegenwart einer Tuberkuloseinfektion vorbeugen soll (Prämunition).

Diesen Zustand stellt sich Calmette (1928) als „die Symbiose lymphatischer Zellen mit einigen auf natürliche Weise unschädlich gewordenen oder künstlich unschädlich gemachten Bazillen" vor. Daher sind wir der Ansicht, daß die Gefahr der Virulenzrestitution dieses alten Typus bovinus besteht, solange er im Organismus verweilt und seine angebliche Schutzkraft entfalten soll.

Diesen theoretischen Erwägungen stehen die praktischen klinischen Erfahrungen der Anhänger und Gegner Calmettes im Für und Wider gegenüber. Auf Grund dieser vielen gegensätzlichen Ergebnisse und der Tatsache, daß der BCG in den Laboratorien der verschiedenen Forscher immer wieder verschiedene und schwankende Pathogenität zeigt (s. auch J. Heimbeck 1932), müssen wir vorläufig noch mit größter Vorsicht den Verlauf der Impfungen, besonders an Rinderbeständen und bei Kindern in hochgradig gefährdetem Milieu, weiterstudieren. Erst wenn wir dort im Verlauf mehrerer Dezennien über die dauernd apathogene Wirkung ein sicheres Urteil gewonnen haben, ist dieser Impfstoff ganz für den Menschen reif. Auf seine noch sehr umstrittene Schutzwirkung soll hier nicht eingegangen werden, ihre Bestimmung ist für deutsche Verhältnisse überhaupt erschwert, weil die Tuberkulose-Morbidität zur Zeit im Abflauen begriffen ist.

Zusammenfassung.

Auf Grund unserer Versuche kommen wir zu folgenden Ergebnissen:

1) Der BCG ist in den minimalen Dosen, in denen sonst Tuberkelbakterien schon sicher letal wirken, absolut unschädlich.

2) In größeren Dosen (10—15 mg bei kleinen Versuchstieren) bewirkt er die Bildung von Tuberkeln, die zwar nicht immer den histologischen, aus Lymphozyten und Epitheloidzellen und typischen Riesenzellen bestehenden Aufbau zeigen, aber besonders in früheren Stadien durch die spezifische Verkäsung ausgezeichnet sind.

3) Der BCG ist, so wie ihn Calmette auf Galle-Glyzerin-Kartoffel-Nährböden züchtet und auf Glyzerin-Kartoffel-Nährböden verschickt, von konstanter Apathogenität für Versuchstiere, aber, absolut gesehen, sicher kein Virus fixe, denn er ist in seinen nosogenen Eigenschaften, je nach dem Nährmedium, auf dem man ihn züchtet, je nach der Wuchsform, in der er wächst, und je nach dem Individuum, auf das er verimpft wird, von

schwankender Infektiosität. Es ließ sich eindeutig feststellen, daß R- und S-Formen auf Ei-Nährböden (Petroff, Petragnani, Hohn) eine relativ größere Infektiosität erlangten, als auf Glyzerin-Kartoffel-Nährböden und auf Sauton. Nie jedoch gelang es, die Pathogenität des BCG durch Anwendung der Eiernährböden oder durch mitogenetische Bestrahlung soweit zu steigern, daß eine generalisierte Tuberkulose mit Fortimpfungsmöglichkeit in Passagen eintrat. Immerhin gelang es, auf Hohnschen Nährböden bei Natrium-taurocholat-Zusatz S-Formen zu züchten, die nach intravenöser Applikation von 15 mg an Kaninchen zu tödlicher, florider, miliarer Tuberkulose der Lunge und Leber führten. Jedoch muß einschränkend bemerkt werden, daß diese Ergebnisse sich nur bei

a) intravenöser Applikation,

b) hohen Dosen von 15 mg,

c) Verimpfung der S-Form in der ersten Passage an Kaninchen erzielen ließen. In der 2. Passage war die größere Pathogenität stets erloschen; ein Beweis dafür, daß weniger die Virulenz des Erregers selbst, als Art und Umstände seiner Applikation entscheidend für den Umfang der beobachteten Läsionen waren!

4) Die größere Pathogenität der S-Form (gegenüber der R-Form) können wir auf Grund unserer Versuche bestätigen, aber ihre maximale Virulenz, wie sie Petroff, Seiffert u. a. beschreiben, haben wir nicht beweisen können.

5) BCG-Kulturen, die auf Petroffschen Nährböden kontinuierlich mitogenetisch bestrahlt wurden, zeigten weder schnelleres Wachstum noch größere Virulenz als unbestrahlte Kulturen. Im Gegenteil scheint es sogar eher zur Verlangsamung des Wachstums und in der Folge durch Anhäufung absterbender Bakterien zu einer wahrscheinlich mehr quantitativ als qualitativ bedingten Herabsetzung der Pathogenität zu kommen.

6) Bei wiederholter Applikation von großen Dosen BCG (zum Teil Organmaterial, zum Teil 10 mg Kulturmaterial) in Abständen von $\frac{1}{4}$—$\frac{1}{2}$ Jahr gelang es nicht, eine Virulenzsteigerung herbeizuführen, bzw. gröbere pathologisch-anatomische Läsionen hervorzurufen. Im Gegenteil führten solche Reinfektionsversuche bei Meerschweinchen und Kaninchen zu geringeren Veränderungen als der Durchschnitt der Erstinfektionen, wie es den Erfahrungen des Kochschen Grundversuches entspricht.

Zum Schluß möchte ich noch meines leider so früh verstorbenen Lehrers Prof. Dr. E. Friedberger gedenken, dessen freundlicher Leitung ich die Durchführung dieser Arbeit zu danken habe. Besonderer Dank sei ferner noch Dr. S. Callerio, damaligem Mitarbeiter am Institut, Frl. stud. med. E. Grzebinasch und Frl. I. Wagner, techn. Vol.-Assist. des Institutes gesagt.

Schrifttum.

Ács, L., Zentralbl. f. Bakt., I Orig., Bd. 120, 1931, S. 116.
Aronson, J. D., and Whitney, C. E., Journ. inf. Dis., 1930, p. 20.
Arzitia, A., Orellana, I., und del Rio, S., Rev. Inst. Bact. Chile, T. 2, 1931, p. 1.
— Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 70, 1931, S. 370.
Gurwitsch, A. und L., Die mitogenetische Strahlung. Berlin 1932, 384 S.
Heimbeck, J., Presse méd., 1932, 1, p. 528.
Hohn, J., Zentralbl. f. Bakt., I Orig., Bd. 121, 1931, S. 488; Lit. s. d.
Jadassohn, J., Die Tb. d. Haut, in Handb. d. Hautkrankh., Bd. 4, Teil 1, 1927, S. 1.
Jaffé, R., Frankf. Zeitschr. f. Pathol., Bd. 17, 1914, H. 1, S. 34.
— Zeitschr. Tbc., Bd. 40, 1924, S. 284.
Kalbfleisch, H. H., und Nohlen, A., Zentralbl. ges. Tbc. forschung, Bd. 31, 1929, S. 433.
Kraus, R., s. b. Uhlenhuth, P., Beitr. Klin. Tbc., Bd. 67, 1927, S. 254.
Lange, B., Erg. ges. Tbc.forschung., Bd. 1, 1930, S. 263.
— Zeitschr. f. Tbc., Bd. 57, 1930, S. 129, 204.
— ebenda, Bd. 59, 1930, S. 1.
— ebenda, Bd. 62, 1931, S. 335.
— ebenda, Bd. 64, 1932, S. 129.
— und Lydtin, K., ebenda, Bd. 50, 1928, S. 45.
Lange, L., Klin. Wochenschr., Jg. 9, 1930, S. 1105.
— Zeitschr. Tbc., Bd. 57, 1930, S. 305.
Nohlen, A., Zentralbl. ges. Tbc.forschung., Bd. 36, 1932, S. 1.
Ramsine, Compt. rend. Soc. Biol., 1928.
Rupilius, C., 1. Beih. z. Arch. f. Kinderheilk., 1931, Stuttgart, S. 56.
Sabin, Doan and Forkner, Journ. exp. Med., Vol. 52, Suppl. 3.
Salkind, S. I., Arch. mikr. Anat. und Entw.mechan., Bd. 104, 1925, S. 116.
Selter, H., und Blumenberg, W., Klin. Wochenschr., Jg. 6, 1927, S. 1134.
Silberschmidt, W., Schweiz. Med. Wochenschr., 1928, Teil 1, S. 85.
— ebenda, 1930, Teil 2, S. 749.
Sumiyoshi, Y., Zeitschr. Tbc., Bd. 39, 1924, S. 333, Bd. 40, S. 338.
Tiedemann, H., J., Zentralbl. ges. Tbc.forschung., Bd. 33, 1930, S. 135.
Uhlenhuth, P., Zeitschr. Tbc., Bd. 64, 1932, S. 135.
Weleminsky, F., Zentralbl. ges. Tbc.forschung, Bd. 33, 1930, S. 129, Bd. 36, 1932, S. 497.
Wolff, L. K., und Ras, G., Zentralbl. f. Bakt., I. Orig., Bd. 123, 1932, S. 257.

II. Experimentelle Virulenzsteigerung von Choleravibrionen durch Selektion überlebender Stämme.

In Parallele zu den von uns durchgeführten Dissoziationsversuchen am BCG in R- und S-Formen und im Zusammenhang mit der Virulenzprüfung der so gewonnenen Varianten wurde in Modellversuchen an Choleravibrionen studiert, ob es gelingt, aus scheinbar homogenen Kulturen verschiedene Kolonieformen und Stämme verschiedener Virulenz abzuspalten.

Anlaß zu diesen Versuchen gab der Lübecker Calmette-Prozeß und die von Petroff inaugurierte Vorstellung, welche die BCG-Katastrophe dort durch die Entstehung einer virulenten S-Variante aus dem avirulenten R-Stamm Calmettes erklären wollte. Prof. Friedberger, der in diesem Prozeß als Sachverständiger mitwirkte, beauftragte uns mit der Ausführung dieser Versuche, um zu zeigen, daß die Aufspaltung von scheinbar avirulenten Kulturen in virulente Varianten prinzipiell möglich ist.

Aehnlich hatte schon 1922 P. H. de Kruif über Individuen verschiedener Virulenz innerhalb einer Kultur von Bazillen der Kaninchenseptikämie (B. cuniculisepticum) berichtet.

Theoretisch maßgeblich war bei unseren Versuchen die alte vererbungswissenschaftliche Vorstellung (P. Eisenberg 1914, E. Gotschlich 1929, H. Poll 1930, E. Friedberger 1930/1), die jede Bakterienkultur als eine aus Plus- und Minusvarianten zusammengesetzte Population ansieht. Diese Theorie wird nicht nur gestützt durch die Erfahrungen der allgemeinen Vererbungsforschung, sondern auch durch Laboratoriumserfahrungen, die man jederzeit an leicht variierenden Bakterienstämmen machen kann. So ist es z. B. bekannt, daß die Kulturen des B. prodigiosum aus einer Mischung von farblosen und braunen Bakterien bestehen, deren gemeinsame Farbmischung der Kultur das rote Kolorit verleiht. Oft passiert es bei der Abimpfung solcher Kulturen, daß man nur farblos wachsende Individuen abimpft und dann in der

Subkultur nur noch den weißen Prodigiosus findet. (Vgl. jedoch hierzu die Farbstoffaufspaltung T. H. Amakos 1930 beim B. prodigiosum.)

Als gelegentlich der Prodigiosumstamm unserer Institutskultur seine rote Farbe verlor und nur noch farblos wuchs, versuchten wir, diesen Stamm wieder zur Rückvariation anzuregen und die Farbstoffleukobase wieder in das leuchtend rote Prodigiosin zurückzuwandeln. Vergeblich probierten wir durch Aenderung der Temperatur, der Sauerstoffspannung und der Wasserstoffionenkonzentration die Farbstoffbildung anzuregen. Dann studierten wir Verbindungen der Alkalireihe (K, Na, Li), Erdalkalien (Ca, Mg, Ba, Sr), Organische Zusätze (Zitronensäure, Oxalsäure, Milchsäure, Weinsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Tyrosin, Asparagin, Pepton, Harnstoff, Harnsäure, Glyzerin). Dann versuchten wir Symbiose mit anderen Bakterien und Ultravioletttbestrahlung; sie versagten alle, ebenso Agar-, Bouillon-, Milch-, Brot-, Gelatine-, Kartoffelkulturen. Aber durch den einfachen Zusatz von Zucker in Form von Saccharose, Maltose und Laktose zu gewöhnlichem Agar gelang es uns mit Leichtigkeit wieder innerhalb einer Generation die ausgiebige Bildung des Prodigiosinfarbstoffes anzuregen, der selbst bei der farbstoffhemmenden Brutschranktemperatur im Uebermaße gebildet wurde[1]).

Auch bei den Choleravibrionen sind Variationen von jeher häufig festgestellt worden.

Nach W. Kolle und R. Prigge (1928) „scheint bei den Vibrionen die Mutation und Variation eine weit größere Rolle zu spielen, als man früher annahm. Alle Eigenschaften des Choleravibrios mit Ausnahme der antigenen und Antikörperreaktionen haben sich, wie namentlich durch die Untersuchung der El Tor-Vibrionen bewiesen wird, als variabel und durch Anpassung bis zu einem gewissen Grade veränderlich herausgestellt, bzw. großen quantitativen Schwankungen unterworfen gezeigt."

Bezüglich der Virulenzsteigerung von Choleravibrionen in vitro liegen Berichte von mehreren Autoren vor: Hueppe und Scholl (1888) steigerten die Virulenz durch anaerobe Kultur im Hühnerei; F. F. Wesbrook (1896) konnte diese Ergebnisse nicht bestätigen.

M. Gruber und E. Wiener (1892) steigerten die Virulenz auf nativen Eiweißnährböden.

Blachstein (1894) steigerte die Virulenz durch fraktionierte Züchtung auf Peptonnährböden mit besonderen Chemikalzusätzen (PO_4, NO_3, SO_4, Na, K, NH_4, Fe).

F. Hamburger (1903) steigerte die Virulenz durch Züchtung in Meerschweinchen- und Choleraimmunserum. Untersuchungen der Paltaufschen Schule konnten nach W. Kolle und R. Prigge (1928) bei Züchtung in Bouillon und Choleraimmunserum diese Ergebnisse bestätigen.

S. I. Zlatogoroff (1911) und L. Horowitz (1911) steigerten die Virulenz durch Agar-, Blutserum-, Meerschweinchenpassagen und Symbiose mit Sarcina lutea; D. Wankel (1912) konnte diese Ergebnisse nicht bestätigen.

---

1) Aehnlich erzielten auch A. Rochaix und E. Bansillon (1923) Farbstoffregeneration beim B. pyocyaneum.

Das Studium der Virulenzveränderlichkeit erschien uns nun nach den Erfahrungen F. Gotschlichs (1906) besonders beim El Tor-Stamm aussichtsvoll. Er hatte bei den aus Mekka zurückkehrenden Pilgern in der Quarantänestation El Tor nach dem Aufhören von Choleraepidemien diese Vibrionen im Stuhl gefunden und sie für mitigierte, nicht mehr infektionstüchtige Varianten der echten Choleravibrionen erklärt (s. a. E. Gotschlich 1929).

Die Grundforderung für die Diagnostik von Varianten und speziell für ihre Selektion ist das Arbeiten mit „Individuallinien" („reinen" Linien, Zweigen, Klonen), d. h. die Aufspaltung der Populationskulturen in einheitliche Plus- oder Minusvarianten. Ueber deren prinzipielle Darstellungsmethoden haben wir an anderer Stelle berichtet (1933). Wir wollen hier berichten über Darstellungsversuche virulenter Varianten, die auf folgenden Wegen der Selektion angestellt wurden.

1. Untersuchung der Virulenz überlebender Stämme in alten Kulturen (Besredka-Phänomen).

Die in unserem Laboratorium vorrätig gehaltene El Tor-Vibrionenkultur hatte sich seit Jahren frei von Bakteriophagen befunden und zeigte dieselben bei entsprechender Analyse nicht; jedoch starben die Agarkulturen von alleine nach 6 Monaten ab. Nun wurde die Virulenz der überlebenden Vibrionen einer gerade 6 Monate alten Kultur (in unten noch zu schildernder Versuchsanordnung) verglichen mit der Virulenz einer seitdem fast täglich fortgeführten Subkultur. Das Ergebnis sprach in 4 untersuchten Fällen gegen einen Virulenzunterschied. Ebenso waren auch morphologische Unterschiede bezüglich Koloniebildung und Gestalt der Vibrionen nicht erkennbar.

2. Untersuchung der Virulenz überlebender Stämme nach Ultraviolettbestrahlung (Radiationsselektion).

Mit einer Hanauschen Quarzlampe wurden Cholera-El-Tor-Kulturen bestrahlt.

Es zeigte sich, daß selbst nach mehrstündiger Bestrahlung (bis zu 6 Stunden) in 20 cm Distanz mit einer noch frischen, wenig benutzten Quarzröhre ein quantitativ verwertbarer Unterschied bezüglich der Selektion oder Virulenzänderung nicht sicher feststellbar war. Wir brachen die Versuche ab, da sich die Apparatur des Institutes hierfür als unzureichend erwies: Man benötigt zu solchen Versuchen eine Höhensonnenvorrichtung, wie sie etwa bei der Milchbestrahlung verwendet wird, wo das zu bestrahlende Medium in kontinuierlicher Bewegung vor der Quarzröhre vorbeifließt. Nur mit Hilfe einer solchen

Apparatur gelingt es, die Fehlerquelle zu vermeiden, die sich aus der ungenügenden Bestrahlung von einzelnen Bakterien ergibt, welche sich mangels genügender Penetrationskraft der Ultraviolettstrahlen der Bestrahlung entziehen können.

3. Untersuchung der Virulenz überlebender Stämme in erhitzten Kulturen (Thermoselektion).

Die Frage, die hier in ausführlicher Bearbeitung gelöst wurde, lautete: Sind die Erreger, die der Abtötung durch Hitze entgehen, virulenter als der Ausgangsstamm? D. h. gelingt die Dissoziation der virulenten Plusvariante einer Populationskultur durch Erhitzung?

Die theoretischen Voraussetzungen dieser Methode erschienen anfangs denkbar ungünstig, denn man muß sich doch vorstellen, daß bei der Erhitzung die einen Bakterien bis zum Absterben geschädigt werden, während andere nur weniger stark betroffen werden, so daß sie gerade noch überleben. Dann war aber kaum zu erwarten, daß die Individuen, die einem so starken thermischen Reiz knapp entronnen waren, auch noch eine gesteigerte Virulenz besitzen sollten. Die Untersuchungen beweisen, daß diese Erwägungen etwa in 75 Proz. der Fälle zutreffen, in anderen 25 Proz. war jedoch ein Wechsel der Virulenz feststellbar. In Uebereinstimmung hiermit stehen Versuche von M. Toyoda (1931), der bei einem Gärtner-Stamm (jedoch nicht bei Strepto- und Pneumokokken) bei Erhöhung der Virulenz umgekehrt auch eine erhöhte Resistenz gegen Hitze und Desinfizienzien feststellen konnte.

Versuchsanordnung und Technik.

Jeder Versuchsturnus beanspruchte den Zeitraum einer halben Woche: 3½ Tage.

1. Tag: Von einer 12—18stündigen Schrägagarkultur unseres Cholerastammes El Tor wurde durch Verreiben mittels einer Platinöse eine feine Emulsion in über 50 ccm physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Nun wurde dieselbe erst im hängenden Tropfen, dann durch Nachfärbung mit Karbolfuchsin auf ihre Homogenität, Reinheit und Beweglichkeit kontrolliert, gleichzeitig wurden Schrägagarsubkulturen angelegt, die der Kontrolle auf Reinheit des Ausgangsstammes dienten. Diese Kochsalzemulsion von El Tor-Vibrionen wurde nun in Dosen von je 2 ccm in 25 Reagenzgläschen gebracht. Um hierbei eine Garantie zu haben für sauberes Arbeiten und Deponierung der Vibrionen ausschließlich am Grunde des Röhrchens, wo später die Erhitzung einwirkt (nicht auch an den oberen Wandungen!), wurde eine von uns ad hoc konstruierte einfache Abfüllvorrichtung benutzt. Diese ähnelt weitgehendst dem Uhlenhuth-Weidanzschen Abfüllaparat für serologische Zwecke: Oben liegt eine Petrischale als Deckel auf einem Trichter, dessen Auslauf einen Gummischlauch mit Klemmschraube besitzt; hier schließt ein nach ccm graduiertes Röhrchen an, das wieder in einen Gummischlauch mit Quetschhahn übergeht; an dem Gummischlauch ist eine Glasglocke von Reagenzglashöhe angebracht, in dessen

Mitte ein spitz ausgezogenes, nur wenig kürzeres Ausflußrohr sich befindet. Hierunter wurden die 25 sterilisierten Reagenzgläschen gehalten, rasch mit 2 ccm El Tor-Vibrionen-Kochsalzemulsion beschickt und mit Wattebausch verschlossen.

Auf gleichartige Emulsion und Verteilung der Choleravibrionen wurde hierbei besonderer Wert gelegt, da nach Versuchen von B. Lange (1922) bekannt ist, daß bei Desinfektionsversuchen die Keimdichte im Medium einen entscheidenden Faktor für den Erfolg der Hitzeeinwirkung und den Verlauf der Keimabtötungskurve darstellt.

Nun folgte der technisch wichtige Vorgang des Abglühens bei jedem Röhrchen, aufsteigend von oberhalb des Flüssigkeitsspiegels. Dieser Vorgang sollte eine Vernichtung etwaiger Choleravibrionen an der Glaswand garantieren, denn bei der nunmehr folgenden fraktionierten Inaktivierung durften nur diejenigen Teile des Glaswandung Vibrionen enthalten, die unterhalb des Wasserbadflüssigkeitspiegels der vollen Inaktivierungstemperatur ausgesetzt wurden. Dann wurden 24 Röhrchen bis zu halber Reagenzglashöhe in ein Wasserbad von 48° C gebracht und nach verschiedenen Zeiten (s. unten Tabelle I) wieder herausgeholt, ein Kontrollröhrchen wurde nicht erhitzt. Es folgte die Aussaat auf Petrischalen und in Bouillon.

2. Tag: Nach 12—18stündiger Bebrütung wurden dann die Kulturen angesehen. Das Ergebnis solch eines Versuches ist in Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I zeigt die auch in anderen Versuchen stets etwas variierende Hitzeresistenz unseres Stammes El Tor, die durchschnittlich bis etwa 12—16 Minuten bei 48° C reicht. Hinterher überleben nur selten einige Vibrionen. Seltsamerweise wurde bei etwas mehr als der Hälfte der Versuche zwischen 16—24 Minuten ein Absterben der Vibrionen beobachtet, während hinterher nach 24—30 Minuten oft noch einige wenige überlebende Keime auftraten. Dieser scheinbar wellenförmige Verlauf der Resistenzkurve, den auch L. Lange (1930) an erhitzten Tuberkelbakterien feststellen konnte, dürfte wohl durch eine gelegentlich nicht ganz homogene Suspendierung zu erklären sein; wobei in solchen Fällen innerhalb eines verklumpten, kleinen Vibrionenagglomerats einige zentral gelegene Vibrionen von der Hitzeeinwirkung länger verschont bleiben, als die mehr kortikal gelegenen.

Bezüglich der Hitzeresistenz der Choleravibrionen geben W. Kolle und R. Prigge (1928) folgende Abtötungszahlen: 80° C — 5 Minuten, 56° C — 30 Minuten.

Einen abweichenden Wert geben K. B. Lehmann und R. O. Neumann (1926): 60° C — 10 Minuten.

Wir können sagen, daß die höchste beobachtete Resistenzzeit 48° C — 30 Minuten betrug.

Die Resistenz in Agar und Bouillon differierte fast stets voneinander, doch mit der gesetzmäßigen Maßgabe, daß die Kultivierung überlebender Vibrionen sicherer in Bouillon als auf Agar gelingt, besonders nach längerem Wachstum (36 Stunden). Diese Tatsache ist wohl einfach durch die Möglichkeit besserer Ernährung in dem die Zellen umspülenden Medium erklärt. Die komplizierte Enderleinsche Anschauung, die hierfür die Möglichkeit einer

Tabelle I.

Inaktivierung von je 2 ccm El Tor-Vibrionenemulsion in physiologischer Kochsalzlösung bei 48° C (Wasserbad) und nachfolgende Aussaat à je 1 ccm in Bouillon und auf Agar-Petri-Platten.

Inaktivierzeit in Minuten	Wachstum nach 18 Stunden	
	Agar	Bouillon
0	++++	++++
2	++++	++++
4	++++	++++
6	++++	++++
8	+++	+++
10	++	+++
12	+	+++
14	+	+++
16	—	++
18	—	+
20	—	+
22	—	+
24	+	+
26	+	—
28	+	—
30	—	+
32	—	—
34	—	—
36	—	—
38	—	—
40	—	—
45	—	—
50	—	—
55	—	—
60	—	—

Zeichenerklärung: — kein Wachstum.

Agar: ganze Platte bewachsen	++++
ca. $^3/_4$—$^1/_2$ Platte bewachsen	+++
ca. $^1/_2$—$^1/_4$ Platte bewachsen	++
vereinzelte Kolonien	+
Bouillon: starke Trübung	++++
mäßige Trübung	+++
schwache Trübung	++
geringe Trübung erst nach 36 Stunden	+

Vermehrung durch Kopulation annimmt, ist durch nichts erwiesen, denn mit Agglomeration allein ist noch nicht die Möglichkeit eines Protoplasmaaustausches gegeben.

Von denjenigen Vibrionenkolonien, die nach der längsten Inaktivierzeit noch angegangen waren, wurden Subkulturen auf Schrägagar angelegt und gleichzeitig mit der ständig auf Schrägagar fortgezüchteten Kontrolle des Ausgangs-Stammes 12/18 Stunden bebrütet.

3. Tag: Nunmehr wurde mit je 4 Stämmen die Virulenzprobe an je 4 gleichaltrigen und gleichschweren Meerschweinchen vorgenommen. Als einheitliches Vergleichsmaß der Infektionsdosis diente eine Normalöse von 1 mm Durchmesser, die ausschließlich für diese Versuche verwendet wurde und von der 2 Oesen stets ausreichten, um ein Meerschweinchen von 200 g in 24 Stunden zu töten, während 1 Oese nie letal wirkte. Wir waren uns dessen wohl bewußt, daß diese Methode reichlich grob ist, und daß Unterschiede von Millionen Vibrionen hierbei unberücksichtigt blieben, jedoch war diese Art der Ungenauigkeit durchaus erwünscht, denn wenn es irgendwie möglich sein sollte, virulentere Stämme durch Hitzeresistenz zu isolieren, so mußte der Unterschied auch bei dieser groben Methode evident werden, sonst war er eben nicht als sicherer Erfolg zu buchen. Um allerdings allzu groben Quantitätsunterschieden aus dem Wege zu gehen, wurden die betreffenden Emulsionen vor dem Infektionsversuch — stets 1 Oese in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung — einfach nephelometrisch bei seitlich einfallendem Lichte verglichen und bei schwankender Dichte neue Emulsionen angefertigt.

K. Iwaszkiewicz und J. Neyman haben 1931 darauf hingewiesen, daß in Virulenzvergleichen bei entsprechenden Mengen von Injektionsflüssigkeiten und gleichen Versuchstieren die Ergebnisse oft voneinander abweichen. Verfasser erklären diese bekannte Tatsache durch die verschiedene Zahl virulenter Keime in der Impfflüssigkeit und durch die individuell verschiedene Empfindlichkeit der Versuchstiere. Wir haben versucht, diese Fehlerquelle zu umgehen durch gleichmäßige Emulsion der Vibrionen, vergleichende Untersuchung von 2 Selektions- und 2 Kontrollstämmen, schließlich Kontrolle der einmal gewonnenen Ergebnisse mit denselben Stämmen an je 2 anderen Versuchstieren.

Die Versuchsanordnung bei den Virulenzvergleichen war folgende: Mit einer der überlebenden Agarkulturen, einer der überlebenden Bouillonkulturen und 2 Kontrollkulturen wurde der Pfeiffersche Versuch ausgeführt. 4 Meerschweinchen von je 200 g Gewicht wurden auf der Bauchseite depiliert, dann wurde mit einem Scherenschlage die Cutis zwischen Proc. xyphoideus und Symphyse parumbilikal wenig (ca. 1 mm) durchtrennt. Schließlich wurde mit stumpfer Kanüle die betreffende Vibrionenemulsion in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung durch die seitlich verschobene Hautwunde intraperitoneal appliziert. Mittels fein ausgezogener Glaskapillaren wurde dann sofort nach dem Versuch, nach 1, 3, 5, und nach 12—18 Stunden wenig Peritonealexsudat entnommen und die Vibriolyse im hängenden Tropfen und nach Karbolfuchsinfärbung kontrolliert.

Es versteht sich, daß diese Technik im Verlaufe der Versuche mancherlei Abänderungen unterlag; doch die Ergebnisse waren immer unabhängig von diesen äußerlichen Versuchsbedingungen und -änderungen. So wurde z. B. statt des Cholerastammes mehrfach ein Typhusstamm („Hagen") probiert, statt der 12—18stündigen Cholerakultur wurde eine 8- oder eine 24stündige, an Stelle der gewöhnlichen, physiologischen Kochsalzlösung in Aqua redest. wurde solche in oligodynamisch wirksamem Aqua dest. aus Kupferkesseln, verwendet, auch das Abglühen der Emulsionsröhrchen wurde gelegentlich unterlassen — alles ohne besondere Unterschiede der Versuchsergebnisse. Oft wurden

auch nicht die letzten nach Inaktivierung noch angegangenen Kulturen auf ihre Virulenz geprüft, sondern die vorangehenden, denn es wäre ja möglich gewesen, daß die letzten überlebenden Vibrionen doch mehr wärmegeschädigt seien, als die kürzere Zeit erhitzten.

Prinzipiell wurde aber bei der Infektion der Meerschweinchen eine Emulsion in physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen und dabei jeder Zusatz von Bouillon usw. peinlichst vermieden. Wir wollten dabei einer von J. Cantacuzène und A. Marie (1919) angegebenen Fehlerquelle aus dem Wege gehen. Diese konnten nämlich zeigen, daß es gelingt, allein vermittels Zusatz eines Dünndarm-Schleimhautextraktes von Meerschweinchen zu Cholerakulturen im Pfeifferschen Versuch die Virulenz zu steigern. Auch die Versuchsanordnung von E. C. Bezzola (1911), der durch Gallezusatz bei intraperitonealer Applikation die Virulenz von Choleravibrionen steigern konnte, zeigt, daß es im Pfeifferschen Versuch auch neben den Erregern auf die zugeführte Emulsionsflüssigkeit ankommt. (Vgl. dazu die Kritik von W. Kolle und R. Prigge 1928.)

Besonderer Wert wurde stets auf die Verwendung gleichaltriger, längstens 18stündiger Kulturen gelegt, denn es ist aus Untersuchungen von E. Gotschlich und J. Weigang (1895) bekannt, daß „junge" Cholerakulturen auf Grund ihres größeren Gehaltes an lebenden Individuen eine viel stärkere Virulenz zu besitzen scheinen als „ältere" Kulturen. Das Auftreten größerer Mengen von abgestorbenen Vibrionen setzt dabei nach etwa 18 Stunden ein.

Nach der im Vorstehenden ausführlich mitgeteilten Versuchsanordnung wurde die Virulenz von 24 nach Erhitzung überlebenden Cholerasubkulturen verglichen mit der Virulenz je zweier unerhitzter Kontrollen des Ausgangsstammes. Die im Pfeifferschen Versuch an Meerschweinchen gewonnenen Resultate (48 Versuchstiere) sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II zeigt in 12 Kolumnen den Virulenzvergleich zwischen je 2 Subkulturen nach Erhitzung und je 2 Kontrollen. In der ersten Querzeile steht stets der nach der Erhitzung überlebende Stamm, der sich auf Agarplatten entwickelte, in der zweiten Zeile folgt der auf Bouillon gezüchtete, dann folgt die Kontrolle, welche ähnlichen Prozeduren (also Emulgierung in physiologischer Kochsalzlösung unter Fortlassung der Erhitzung) unterworfen worden war; schließlich folgt die einfach ständig auf Agar fortgeführte Subkultur des Ausgangsstammes als Kontrolle.

Ein Vergleich der 12 Querkolumnen zeigt uns nun besonders bei Betrachtung der letzten rechten Spalte (Ausgang), daß nur in den 4 bzw. 6 Fällen (No. 5, 17, 21, 22, 25, 26) der Stämme II, V, VI, VII, eine Virulenzänderung nach der Erhitzung feststellbar ist; das beweist der in diesen Fällen eingetretene Tod der Versuchs-

Tabelle II.

Virulenzprüfung von Choleravibrionen an Meerschweinchen nach intraperitonealer Applikation von 1 Oese El Tor-Vibrionen in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Vergleich der hitzeresistenten Kulturen mit dem nicht-erhitzten Ausgangsstamm „K".

Lf. No.		Gew. in g	Inaktivierung bzw. Kontrollen	Peritonealexsudat nach					Ausgang
				Inj.	1 Std.	3 Std.	5 Std.	18 Std.	
I.	1	240	48° C 9 Min.	+++	+	—	—	—	lebt
	2	260	48° C 9 Min.	+++	+	—	—	—	lebt
	3	250	K in NaCl	+++	+	+	—	—	lebt
	4	240	K auf Agar	+++	++	++	+	—	lebt
II.	5	250	48° C 9 Min.	+++	+++	+++	+++	—	tot
	6	250	48° C 8 Min.	+++	++	+	+	—	lebt
	7	240	K in NaCl	+++	+	—	—	—	lebt
	8	260	K auf Agar	+++	++	+	—	—	lebt
III.	9	240	48° C 8 Min.	+++	+	+	—	—	lebt
	10	230	48° C 8 Min.	+++	+	+	—	—	lebt
	11	250	K in NaCl	+++	+	+	—	—	lebt
	12	230	K auf Agar	+++	+	+	—	—	lebt
IV.	13	250	48° C 16 Min.	+++	+	—	—	—	lebt
	14	250	48° C 18 Min.	+++	+	—	—	—	lebt
	15	250	K in NaCl	+++	++	+	+	—	lebt
	16	250	K auf Agar	+++	+	+	—	—	lebt
V.	17	250	48° C 12 Min.	+	++	+++	+++	—	tot
	18	240	48° C 12 Min.	+	—	—	—	—	lebt
	19	250	K in NaCl	+	+	—	—	—	lebt
	20	250	K auf Agar	+	+	—	—	—	lebt
VI.	21	250	48° C 12 Min.	+	++	+++	+++	+++	tot
	22	240	48° C 12 Min.	+	++	+++	+++	+++	tot
	23	250	K in NaCl	+	+	+	—	—	lebt
	24	250	K auf Agar	+	+	—	—	—	lebt
VII.	25	220	48° C 24 Min.	+	++	+++	+++	+++	tot
	26	200	48° C 24 Min.	++	+++	+++	+++	+++	tot
	27	210	K in NaCl	++	+	—	—	—	lebt
	28	210	K auf Agar	+++	+	+	—	—	lebt
VIII.	29	250	48° C 24 Min.	+++	++	+	—	—	lebt
	30	230	48° C 28 Min.	++	++	+++	++	—	lebt
	31	250	K in NaCl	+++	++	—	—	—	lebt
	32	220	K auf Agar	++	++	++	—	—	lebt
IX.	33	220	48° C 22 Min.	++	+++	+	—	—	lebt
	34	230	48° C 24 Min.	++	+++	++	+	—	lebt
	35	210	K in NaCl	++	+++	+	—	—	lebt
	36	220	K auf Agar	++	+++	+	—	—	lebt
X.	37	210	48° C 14 Min.	++	+++	+++	+	+	lebt
	38	220	48° C 16 Min.	+++	++	+	—	—	lebt
	39	220	K in NaCl	++	+++	++	+	—	lebt
	40	230	K auf Agar	+++	++	+	—	—	lebt

Tabelle II (Fortsetzung).

Lf. No.	Gew. in g	Inaktivierung bzw. Kontrollen	Peritonealexsudat nach					Ausgang
			Inj.	1 Std.	3 Std.	5 Std.	18 Std.	
XI. 41	200	45° C 30 Min.	+++	++	+	—	—	lebt
42	230	45° C 40 Min.	+++	++	+	—	—	lebt
43	210	K in NaCl	+++	++	+	+	—	lebt
44	230	K auf Agar	+++	++	+	—	—	lebt
XII. 45	200	48° C 10 Min.	+++	++	++	+	—	lebt
46	210	48° C 12 Min.	+++	++	+	—	—	lebt
47	190	K in NaCl	+++	++	+	—	—	lebt
48	200	K auf Agar	+++	++	+	—	—	lebt

Zeichenerklärung: +++ viel Vibrionen,
++ mäßig viel Vibrionen,
+ wenige Vibrionen,
— keine Vibrionen.

tiere. Von einer qualitativen Verwertung der Ergebnisse bei den Peritonealexsudaten zu den verschiedenen Stunden muß jedoch strikte abgesehen werden, denn es zeigte sich, daß deren quantitativen Ergebnisse und Abstufungen mehr von der Reaktionsbereitschaft des Versuchstieres und vielleicht auch von anderen Zufällen bei der Exsudatentnahme abhängig sind, als von der Virulenz des Cholerastammes.

Die gestorbenen Tiere wurden seziert und auf den einwandfreien Verlauf der Cholerainfektion hin kontrolliert. Es ergab sich stets eine serös-hämorrhagische, wenig fibrinöse Peritonitis, die kulturell als reine Cholerainfektion imponierte und deren Erreger mit Leichtigkeit rein züchtbar waren. Eine weiter fortgeführte Virulenzprobe mit diesen herausgezüchteten Erregern bewies wohl eine gesteigerte Virulenz der neuen El Tor-Stämme bei Vergleich mit den Kontrollen, doch ließen sich diese Ergebnisse leider vergleichend nicht verwerten, da erfahrungsgemäß bei jeder Ueberimpfung von Laboratoriumsstämmen auf Versuchstiere eo ipso eine Virulenzsteigerung auftritt.

Dagegen war eine weitere Dissoziation der 4 (bzw. 6) virulenteren Subkulturen durch nochmalige Hitzeselektion erfolgreich: Die so gewonnenen 6 Stämme zeigten wieder im Tierversuch wie oben eine stärkere Virlulenz als die Kontroll-Ausgangs-Stämme. So gelang es später schon mit einer halben Oese Vibrionen statt mit einer ganzen die Meerschweinchen im Pfeifferschen Versuch zu töten; allerdings war es nicht möglich, die Virulenz ad libitum zu steigern, die Natur setzte diesen Versuchen an einem Punkte eine scheinbar im Laboratoriumsversuch unüberwindliche Schranke entgegen.

Wir können also zusammenfassend sagen, daß es uns durch Hitzeselektion bei Choleravibrionen in etwa ¼ der Fälle gelungen ist, relativ virulentere Stämme zu isolieren, eine weiter-

gehende absolute Virulenzsteigerung mißlang jedoch. Scheinbar ist die Methode der Hitzeselektion doch mit gewissen Schädigungen des Protoplasmas bei den überlebenden Stämmen verbunden. Andererseits kann es durch Selektion auch niemals gelingen, Stämme zu isolieren, die eine größere Virulenz besitzen als der Ausgangsstamm früher einmal hatte und als seine Plusvarianten innerhalb der Population sie bewahrt haben.

Fälle von Virulenzabschwächung waren bei dieser Methodik mit Sicherheit nicht nachweisbar, denn als Nachweis hierfür hätte nur der quantitative Vergleich des Ausfalles der Pfeifferschen Probe in den Peritonealexsudaten dienen können. Diese sprach tatsächlich in einigen Fällen (s. d. Querspalten I und IV in Tabelle II) für die Möglichkeit einer Virulenzherabsetzung bei den erhitzten Stämmen; jedoch erachten wir dieses Kriterium, wie schon oben berichtet, nicht als sicher genug, insbesondere weil die Schwankungen des Peritonealexsudatbefundes nach der positiven Seite auch nicht immer der stärkeren Virulenz und dem letalen Ausgange entsprachen.

Eine Variation der Kolonieform, wie sie W. Kolle (1903 2 Typen), K. Baerthlein (1912 3 Typen), Trautmann und Gaehtgens (1913 4 Typen), P. Eisenberg (1914 4 Typen), E. Csernel (1913 zahlreiche Intermediärtypen), ferner L. Händel (1912), V. Puntoni (1913), P. G. Olssen (1915), O. Bail (1915) beschreiben, konnten auch wir feststellen: Wir fanden neben den tautropfenähnlichen, durchsichtigen Agarkolonien auch solche trüberen, körnigen Aussehens, die an Colikulturen erinnerten. Hinsichtlich der Virulenz dieser Vibrionenkolonien konnten wir jedoch keinerlei Differenzen bemerken. Hingegen gelang es uns durch Tierpassage aus dem lebhaft beweglichen Stamm eine unbewegliche Variante abzuspalten, doch waren auch hier keine Unterschiede der Virulenz oder der Morphologie zu entdecken. Auch K. Baerthlein, der 1912 bei seinen klassischen „Mutationsversuchen" an verschieden wachsenden Choleravibrionen Virulenzversuche anstellte, konnte sowohl im Pfeifferschen Versuch als auch bei intravenöser Kaninchen infektion keine Virulenzunterschiede diagnostizieren.

Es bleibt die Frage zu entscheiden, ob die von uns ermittelte höhere Virulenz ein Ausdruck gesteigerter Toxinbildung, der gesteigerten Vermehrung oder der Neigung zur Septikämie mit Hämolysinbildung ist. Auf Grund der von uns gewählten Versuchsanordnung nach Pfeiffer war festzustellen, daß Virulenz und Vermehrung rein zahlenmäßig nicht in sicherer korrespondierender Wirkung zueinander standen. Ebenso gelang uns auch die Blutkultur nicht. Deshalb ist unseres Erachtens wohl anzunehmen, daß die hier beschriebene Virulenzsteigerung im wesentlichen auf der Auswahl und Vermehrung toxinreicherer Choleravibrionen beruhte. Daß gerade der Toxingehalt (wie auch der Hämolysin-

gehalt) bei den Choleravibrionen ein schwankender ist, ist von überaus zahlreichen Autoren beschrieben worden (s. bei W. Kolle und R. Prigge 1928). Auch der von R. Kraus entfesselte Streit über die Ekto- und Endotoxine der Choleravibrionen hat die Variabilität dieser Eigenschaften gezeigt. (Vgl. auch die neueren Anschauungen J. J. van Loghems 1932 hierüber.)

Bei einer vergleichenden Betrachtung der vorstehend berichteten Ergebnisse ist zu sagen: Von 24 durch Hitzeeinwirkung dissoziierten El Tor-Kulturen gelang es uns, in 4 (bzw. 6) Fällen virulentere Stämme zu isolieren; andere Differenzen (avirulentere Stämme) waren mit Sicherheit nicht feststellbar.

Interessant ist hier ein Vergleich mit noch unveröffentlichten Versuchen, die an unserem Institute von I. Gurwitz ausgeführt worden sind. Hier lagen die Erfahrungen sogar noch wesentlich besser; denn es gelang Gurwitz bei 24 ähnlichen Versuchen durch Hitzeselektion 10 Stämme zu isolieren, die eine größere Virulenz zeigten; 3 Stämme zeigten eine geringere Virulenz als die Kontrollen, an den anderen Stämmen waren wesentliche Aenderungen der Virulenz nicht feststellbar.

Diskussion der Ergebnisse.

Es ergeben sich nunmehr folgende Fragen:

1) Ist die Tatsache, daß es in 6 von 24 Fällen gelang, nach Hitzeselektion von Choleravibrionen bei den überlebenden Stämmen eine größere Infektiosität für Meerschweinchen zu erreichen, beweisend für eine Virulenzsteigerung der untersuchten Kulturen?

Was dagegen spricht, ist die Unmöglichkeit, diese Virulenz ad libitum zu steigern, sei es in Subkulturen oder durch weitere Thermoselektion. Wir glauben jedoch, daß diese begrenzte Virulenzsteigerungsmöglichkeit durch die angewendete Selektionsmethodik hinreichend erklärt ist: Man kommt hierbei eben nur bis an die Grenze der Plusvariation, nicht weiter. Für die Steigerung der Virulenz spricht die Tatsache, daß gegenüber den Kontrollen erhitzte Stämme überhaupt stärker krankheitserregend wirken konnten, allein diese Tatsache ist doch recht beachtlich; denn man nimmt doch allgemein an, daß man durch Anwendung von Hitze den Virulenzgrad bei einer Kultur mitigieren kann und zahlreiche Schutzimpfungsverfahren basieren auf dieser Erfahrung. Es lag daher doch nahe, durch die hier angewandte brüske Methode der Erhitzung von Vibrionenemulsionen ähnlich wie bei der Hitzekultur eher eine Schädigung und Virulenzabschwächung der überlebenden Vibrionen zu erwarten. Daß diese Erwartung wohl in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle zutrifft, zeigt auch das seltenere Vorkommen der virulenten Stämme (20 bis 25 Proz.).

2) Eine weitere Frage ist die: Spricht die Seltenheit eines Variationsbefundes und die schwere Reproduzierbarkeit desselben gegen ihn? Sicher nicht, denn wir kennen noch nicht die wahren Ursachen, welche Variationen

bei Bakterien auslösen, sondern wir kennen nur gewisse Bedingungen, unter denen sie bei Bakterien auftreten können. Diese Tatsache verleiht der Möglichkeit der Variation einen etwas „mystischen" Beigeschmack, denn wir sind gewohnt, in der exakten Wissenschaft eine Reproduzierbarkeit aller Versuche zu fordern. Leider zwingen uns die Variationsstudien bei Bakterien im Verlaufe der letzten Jahre[1]), auf diese Grundforderung so lange zu verzichten, als wir noch nicht die Geheimnisse der Variation erforscht haben. So stellt auch die Methode der Selektion ein wenig dankbares Gebiet der Variationsforschung dar, dessen Problematik nicht durch Mehrheit und Regel entschieden werden kann. Immerhin weisen uns auch die Mutationserfahrungen in der Makrobiologie (de Vries, Tschermak, Correns) auf die Abkehr von apodiktischen Reglements der Naturgeschehnisse hin, und wenn man unbeschadet der alten Erfahrungen von der Konstanz der Arten allein die theoretische Möglichkeit des absolut gesehen doch seltenen Variationsphänomens ins Auge faßt, so kann dieser Gesichtspunkt der Sorgfalt unserer Forschungsmethoden nur förderlich sein.

3) Welche theoretischen Folgerungen ergeben sich aus der Tatsache, daß es in einigen Fällen gelang, eine Kultur in virulente und weniger virulente Formen aufzuspalten? Für den biologisch-vererbungswissenschaftlichen Standpunkt resultiert die Richtigkeit der Lehre von der Populationsstruktur der Bakterienkulturen und der Existenz von Plus- und Minusvarianten in der Mikrobiologie. Vom bakteriologischen Standpunkt aus stellt diese Tatsache eine bedeutungsvolle Mahnung dar, bei der Wertung der Virus-fixe-Qualität eines Erregers Vorsicht walten zu lassen. Die Variationsmöglichkeit der Populationskulturen muß uns besonders aus Unkenntnis ihrer Genese zur Vorsicht mahnen. Insofern ist auch die Forderung der Nachprüfung aller Impfstoffe durch staatliche Institute sowohl vom Gesichtspunkt der öffentlichen Sicherheit als auch von dem der Forschung aus sehr zu begrüßen (s. hierzu auch die Verhandlungen des Reichsgesundheitsrates am 12./13. Dezember 1930).

Zusammenfassung.

1) Es wird durch die Methodik der Selektion eine Aufspaltung von Populationskulturen bei Choleravibrionen (El Tor) in Varianten der Kolonieform und der Virulenz versucht.

2) Als Selektionsverfahren bedienten wir uns der Auswahl überlebender Stämme in

a) alten Kulturen (Besredka-Phänomen),

b) ultraviolett bestrahlten Kulturen (Radiationsselektion),

c) erhitzten Kulturen (Thermoselektion).

3) Besredka-Phänomen: Die Virulenz und Kolonieform von El Tor-Vibrionen, die nach 6 Monaten in alten Agarkulturen noch isoliert werden konnten, differierte nicht von den entsprechenden

1) BCG-Dissoziation nach S. A. Petroff, W. Seiffert u. a.

Eigenschaften, der inzwischen täglich ab- und weitergeimpften Subkulturen.

4) Radiationsselektion: Virulenz- und Kolonieunterschiede zwischen ultraviolett bestrahlten Choleravibrionen und ihren unbestrahlten Kontrollen konnten ebenfalls nicht festgestellt werden.

5) Thermoselektion: Es wurden El Tor-Kulturen erhitzt und die Virulenz der bei 48° C noch überlebenden Vibrionen (nach einer Expositionszeit von 8—28 Minuten) im Pfeifferschen Versuch geprüft: In 4 bzw. 6 von 24 Fällen gelang es, Stämme zu isolieren, die eine größere Virulenz für Meerschweinchen zeigten als die Ausgangskultur. Wir führen dieselbe auf eine gesteigerte Toxizität, d. h. auf die Isolierung und Selektion von toxinreicheren Plusvarianten der Populationskultur zurück.

6) Die Aenderung der Virulenz war jedoch nicht gebunden an besondere ins Auge fallende Eigenschaften der Kultur. Untersuchungen an Varianten unbeweglicher Vibrionen, ferner an trüb, gekörnt, coliähnlich wachsenden Vibrionenvarianten ergaben keinerlei erkennbare Virulenzunterschiede.

7) Die längste beobachtete Hitzeresistenz unserer El Tor-Vibrionen (in physiologischer Kochsalzlösung emulgiert) betrug bei 48° C 30 Minuten im Wasserbad.

8) Bei einer vergleichsweise durchgeführten Untersuchung der Variationsmöglichkeiten des Prodigiosumpigments wurde festgestellt, daß es durch Zusatz von Saccharose, Maltose oder Laktose zum Nähragar leicht gelingt, einen hartnäckig weiß wachsenden Prodigiosumstamm in die rot wachsende Form zurückzuwandeln.

Zum Schluß möchte ich noch dankend meines leider so früh verstorbenen Lehrers E. Friedberger gedenken, dessen freundlicher Leitung ich die Durchführung dieser Arbeit zu danken habe. Besonderer Dank sei ferner noch der Mitarbeit der beiden Volontär-Assistentinnen des Instituts gesagt, die mir bei der Ausführung vorstehender Versuche wertvolle Hilfe leisteten: Frl. stud. med. Edith Grzebinasch und Frl. Irmgard Wagner.

Schrifttum.

Amako, T. H., Zentralbl. f. Bakt., I Orig., Bd. 116, S. 494, 499, 505.
Bail, O., Zentralbl. f. Bakt., I Orig., Bd. 77, 1915, S. 234.
Bezzola, E. C., Zentralbl. f. Bakt., I Orig., Bd. 69, 1911, S. 133.
Cantacuzène, J., et Marie, A., Compt. rend. Soc. Biol., T. 82, 1919, S. 842.

Gotschlich, E., und Weigang, J., Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 20, 1895, S. 376.
— Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 53, 1906, S. 281.
Kolle, W., Klin. Jahrb., Bd. 11, 1903, S. 367/418.
— und Prigge, R., Cholera asiatica, in Kolle-Kraus-Uhlenhuth, Handb. d. pathog. Mikroorganismen, 3. Aufl., Bd. 4, Teil 1, 1928, S. 1—124.
Lange, B., Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 96, 1922, S. 22/117.
Loghem, J. J. van, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 114, 1932, S. 20/30.
Olsson, P. G., Zentralbl. f. Bakt., I Orig., Bd. 76, 1915, S. 23.
Puntoni, V., Bull. d. Science med., Jg. 84, Vol. 1, 1913, p. 9.
Rochaix, A., et Banssillon, E., Compt. rend. Soc. Biol., T. 89, 1923, p. 538/9.
Sulmann, F., Variationen bei Bakterien, 1933, Refuah.

Lebenslauf.

Am 30. März 1907 wurde ich, Felix Sulmann, als Sohn des Kaufmanns Bernhard Sulmann und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Wittkowsky zu Berlin geboren. Ich bin deutscher Staatsangehörigkeit, jüdischer Abstammung und Religion. Von Ostern 1913 bis 1925 besuchte ich die Hohenzollern-Oberrealschule zu Berlin-Schöneberg, die ich mit dem Zeugnis der Reife verließ. Im Frühjahr 1925 ging ich zur Eröffnung der hebräischen Universität nach Palästina, kehrte aber alsbald nach Berlin zurück, um hier Medizin und Veterinärmedizin zu studieren. Mit Erlaubnis des Reichsinnenministeriums belegte ich gleichzeitig Vorlesungen an der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Wilhelms-Universität und der Tierärztlichen Hochschule. Im Herbst 1932 hatte ich beide Studien beendet, darauf arbeitete ich ½ Jahr als Medizinalpraktikant am Städtischen Krankenhaus Berlin-Reinickendorf, das ich am 31. März 1933 verließ, um nach Palästina zu gehen.

Während meiner 8jährigen Ausbildungszeit habe ich folgende Examina abgelegt: Latinum, Vet.-Physikum, Vet.-Staatsexamen, Dr. med. vet., Med.-Physikum, Med.-Staatsexamen. Durch die Einreichung vorliegender Dissertation ist die Erlangung des ärztlichen Doktortitels (Rigorosum) geplant.

Felix Sulmann, Jerusalem.